

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA – FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Medicina**

---



**Estudio del papel de las rho-quinasas en la respuesta  
inflamatoria inducida por el alcohol**

**Tesis Doctoral**

**PABLO SEGOVIA ALONSO**

**2020**



D. MIGUEL MARCOS MARTÍN. PROFESOR TITULAR DE  
MEDICINA. DEPARTAMENTO DE MEDICINA.  
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado **“Estudio del papel de las rho-  
quinasas en la respuesta inflamatoria inducida por el alcohol”**  
que presenta D. Pablo Segovia Alonso, ha sido realizado bajo su  
dirección en el Departamento de Medicina, y reúne, a su juicio,  
originalidad y contenido suficientes para que sea presentado ante  
el tribunal correspondiente y optar al Grado de Doctor por la  
Universidad de Salamanca.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, expide el  
presente certificado en Salamanca, a 1 de octubre de 2020.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Miguel Marcos Martín', is written over a faint, circular official stamp. The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo: M. Marcos Martín



*A mis padres*

*A Sara*

Quiero expresar mi agradecimiento:

Al profesor Miguel Marcos Martín, director de este trabajo, pero sobre todo, ejemplo de cómo un buen médico no sólo es aquel que de Medicina sabe. Su amabilidad, comprensión y cercanía durante todos estos años, me han guiado en el mundo de la Medicina asistencial y posteriormente, en el campo de la investigación. No existen palabras para expresar el agradecimiento que le debo por todo su tiempo y apoyo en la realización de esta Tesis. Asimismo me gustaría mostrar mi agradecimiento al profesor Francisco Javier Laso Guzmán, el cual no solo me inició en el mundo de la Patología Médica en mis inicios como estudiante de Medicina, sino que me ha apoyado en los años posteriores tanto en mi formación como Médico Internista así como en lo inicios de la realización de este trabajo.

A los pacientes y voluntarios que accedieron a participar en este trabajo de manera desinteresada. Gracias a ellos, este estudio ha sido posible.

A todos los compañeros de la Unidad de Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, por su cálida acogida y colaboración.

A Marian Pérez y a Nieves Mateos, por su ayuda técnica y su infinita paciencia.

A la Dra. Almeida y al Dr. Bolaños, así como a sus grupos de investigación, por su ayuda y material aportado.

A mis amigos, por haber tolerado de manera estoica todas las horas de conversación sobre un tema, que a la mayoría les es ajeno.

A mis padres, por su cariño y apoyo incondicional, siempre, en los malos y buenos momentos. Gracias a ellos, el camino emprendido hace ya tantos años se ve realizado ahora. Nunca podré agradecer lo suficiente toda la ayuda, todos los sacrificios y toda su dedicación. Algún día espero ser capaz de devolverles todo lo que le me han dado en esta vida. Gracias, siempre.

Y por último, a Sara. Gracias por su amor, cariño y comprensión, los cuales han sido imprescindibles en éste y en otros muchos aspectos de mi vida.

*El vino es una cosa maravillosamente apropiada para el hombre si, en tanto en la salud como en la enfermedad, se administra con tino y justa medida. Hipócrates de Cos (460 a. C.-370 a. C.)*

# ÍNDICE

---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>El consumo del alcohol en la Historia</b>	<b>11</b>
<b>Epidemiología del consumo de alcohol en el mundo</b>	<b>14</b>
El consumo de alcohol en España	17
<b>Daño orgánico inducido por consumo de alcohol</b>	<b>21</b>
Patogenia de la enfermedad hepática alcohólica	21
Efecto tóxico directo del etanol	23
Alteración del metabolismo celular	25
Alteración del sistema inmune innato	27
Hepatopatía alcohólica, disbiosis y sistema inmune.	27
Daño inducido por el alcohol en el sistema nervioso central	34
<b>Las rho-quinasas y su papel en la respuesta inflamatoria</b>	<b>36</b>
Las rho-quinasas y la respuesta inflamatoria ligada al NF-κB	40
Las rho-quinasas y la respuesta inflamatoria inducida por el alcohol	43
<b>Polimorfismos genéticos en las rho-quinasas e inflamación asociada al consumo de alcohol</b>	<b>45</b>
Polimorfismos genéticos de las rho-quinasas analizados en nuestro trabajo	48
Polimorfismo rs35996865 del gen <i>ROCK1</i>	48
Polimorfismos rs978906 y rs2230774 del gen <i>ROCK2</i>	49
 <b>OBJETIVOS</b>	 <b>52</b>
 <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	 <b>53</b>
<b>Análisis de la expresión de rho-quinasas en sangre periférica</b>	<b>53</b>
Muestra objeto de estudio	53
Extracción y análisis de ARNm en sangre periférica	55
<b>Análisis de la expresión de rho-quinasas <i>in vitro</i> en células mononucleadas de sangre periférica</b>	<b>55</b>
Extracción de muestras y separación de células mononucleadas	55
Incubación de células con etanol y obtención de ARNm	58
<b>Análisis de la expresión de las rho-quinasas en astrocitos murinos <i>in vitro</i></b>	<b>62</b>
Obtención de las muestras	62
Cultivo de astrocitos	63
Resembrado de astrocitos y cultivo con etanol	65



<b>Síntesis de ADNc a partir de ARN y determinación de la expresión de las rho-quinasas</b>	<b>67</b>
Síntesis de ADNc a partir de ARN	67
Cuantificación de la expresión génica mediante PCR	68
<b>Análisis de los polimorfismos genéticos en pacientes con consumo excesivo de alcohol y/o hepatopatía alcohólica</b>	<b>71</b>
Muestra objeto de estudio	71
Extracción de ADN genómico	73
Análisis de polimorfismos genéticos en el ADN obtenido	75
<b>Condiciones de la PCR para los polimorfismos genéticos analizados</b>	<b>78</b>
<b>Polimorfismos genéticos estudiados</b>	<b>79</b>
Polimorfismo rs35996865 (T>G) del gen <i>ROCK1</i>	79
Polimorfismo rs2230774 (G>T) del gen <i>ROCK2</i>	80
Polimorfismo rs978906 (T>C) del gen <i>ROCK2</i>	81
<b>Métodos estadísticos</b>	<b>82</b>
<b>Financiación</b>	<b>83</b>
<hr/>	
<b>RESULTADOS</b>	<b>84</b>
<b>Análisis de la expresión de las rho-quinasas en sangre periférica de pacientes con intoxicación alcohólica aguda.</b>	<b>84</b>
Características de la muestra	84
<b>Expresión relativa del ARNm de ROCK1 y ROCK2 en sangre periférica</b>	<b>85</b>
Influencia de la edad en la expresión relativa del ARNm de ROCK1 y ROCK2 en sangre periférica	86
Influencia del sexo en la expresión relativa del ARNm de ROCK1 y ROCK2 en sangre periférica	87
<b>Correlación entre la expresión del ARNm de rho-quinasas, mediadores inflamatorios y TLR y niveles de etanol</b>	<b>88</b>
Correlación entre la expresión de ROCK1, ROCK2 y la alcoholemia	88
Correlación entre la expresión relativa de ARNm de ROCK1 y ROCK2 y la de TLR durante el episodio de intoxicación alcohólica	92
Correlación entre la expresión relativa de ARNm de ROCK1 y ROCK2 y de citoquinas inflamatorias (IL1- $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ ) durante el episodio de intoxicación alcohólica	95
<b>Expresión de rho-quinasas en un modelo celular <i>in vitro</i> tras la exposición a etanol</b>	<b>100</b>
Expresión de rho-quinasas en células mononucleadas de sangre periférica expuestas a etanol	100
Expresión de rho-quinasas en astrocitos de ratón expuestos a etanol	101
<b>Asociación entre los polimorfismos genéticos de las rho-quinasas y la presencia de enfermedad asociada al consumo de alcohol</b>	<b>102</b>

Polimorfismo rs35996865 del gen <i>ROCK1</i>	102
Polimorfismo rs2230774 del gen <i>ROCK2</i>	103
Polimorfismo rs978906 del gen <i>ROCK2</i>	105
<b>Estudio funcional de los polimorfismos rs35996865 de <i>ROCK1</i> y rs2230774, rs978906 de <i>ROCK2</i></b>	<b>107</b>
Análisis de la muestra global	107
Análisis de los casos	110
Análisis de los controles	112
<hr/> <b>DISCUSIÓN</b>	<hr/> <b>113</b>
<b>Expresión de rho-quinasas <i>in vivo</i> durante el episodio de intoxicación aguda o consumo intensivo de alcohol</b>	<b>114</b>
Consideraciones metodológicas	114
<b>Resultados de la expresión de las rho-quinasas <i>in vivo</i></b>	<b>122</b>
Expresión relativa del ARNm de ROCK1 y ROCK2 en sangre periférica	122
Correlación con citoquinas inflamatorias	125
<b>Expresión <i>in vitro</i> de rho-quinasas tras la exposición a etanol</b>	<b>136</b>
Consideraciones metodológicas	136
Resultados en células mononucleadas de sangre periférica	139
Resultados en astrocitos de ratón expuestos a etanol	142
<b>Estudio de asociación de genes candidatos</b>	<b>145</b>
Consideraciones metodológicas	145
Análisis estadístico	152
Polimorfismo rs35996865 del gen <i>ROCK1</i>	153
Polimorfismos rs2230774 y rs978906 del gen <i>ROCK2</i>	158
<hr/> <b>CONCLUSIONES</b>	<hr/> <b>163</b>
<hr/> <b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<hr/> <b>164</b>
<hr/> <b>ANEXOS</b>	<hr/> <b>198</b>

# INTRODUCCIÓN

## EL CONSUMO DEL ALCOHOL EN LA HISTORIA

El consumo de alcohol se ha realizado desde los albores de la Humanidad. Diferentes fuentes sugieren que la producción de bebidas mediante la fermentación del alcohol tuvo su origen en el Neolítico, nada menos que 10000 años antes de Cristo.<sup>1</sup> Los humanos primitivos comenzaron a perfeccionar el arte de la fermentación utilizando para ello aquellas plantas que contenían tanto almidón como azúcar.<sup>2</sup> Ya en el Antiguo Testamento, se hace referencia no sólo al cultivo de la vid para la obtención del vino, sino a su efecto embriagador en la figura de Noé, tras sobrevivir al Diluvio.<sup>3</sup> En la antigua Babilonia, se han llegado a encontrar tablas de arcilla con diferentes recetas de cerveza y una tablilla cuneiforme sumeria datada en el año 2100 antes de Cristo, la cual se conserva como el registro más antiguo de la elaboración de alcohol para uso medicinal.<sup>4</sup>

Aunque los principios de la destilación ya eran conocidos por los antiguos griegos y romanos (incluso Hipócrates recomendaba el consumo de vino para disminuir la aflicción de ciertos males), fueron alquimistas árabes quienes alrededor del año 700 después de Cristo, perfeccionaron el proceso para la destilación del alcohol, el cual usaban con propósitos medicinales diversos. Durante la Edad Media, diferentes sociedades europeas comenzaron a sintetizar distintos derivados del alcohol que variaban según su origen. Así, podemos encontrar referencias al “*acqua di vita*” en Italia, la “*eau de vie*” en Francia o, finalizando el siglo XV, el “*uisce beatha*”, el equivalente irlandés al “agua de vida” o “*whiskey*”. Tal era la importancia del mismo y su integración en la vida cotidiana que incluso el papa Gregorio IX en el siglo XIII

tuvo que decretar un edicto para anular los bautismos con cerveza que se llevaban a cabo en algunos países nórdicos como Noruega. Por otro lado, en los años de la Peste Negra (1347-1351), y sin cura conocida para la misma, el vino era usado en los afectados por esta enfermedad con el fin de aliviar el dolor e inducir vitalidad en los enfermos.<sup>5</sup>

La palabra alcohol aparece en el siglo XVI, siendo una derivación de la palabra árabe “*al-koh’l*”, si bien en este caso era referido a un polvo fino de antimonio, utilizado para adornar los párpados de las mujeres. Fue el alquimista alsaciano Hieronymus Brunschwig, quien, en el año 1500, describió el proceso de la destilación en su libro “*Liber de arte distillandi*”, el primer manual impreso sobre el proceso de destilación.<sup>6</sup> En pleno siglo XVIII, y con el objetivo de dotar a Inglaterra de una bebida nacional alternativa al brandy francés en una época de conflicto entre los dos países, la destilación de bebidas alcohólicas alcanzó su máximo esplendor en la figura de la ginebra. Su producción se incrementó rápidamente, llevando a la sociedad inglesa, especialmente en las grandes ciudades como Londres, a una epidemia virtual de embriaguez extrema entre la población obrera. Este periodo, conocido como el “*gin craze*”, fue el responsable de la creación de hasta cinco actas legislativas por el Parlamento británico con el objetivo de frenar y controlar su producción, distribución y consumo, debido al pánico de la clase gobernante ante un probable colapso de la sociedad.<sup>7</sup>

Los efectos secundarios sobre la salud del alcoholismo empiezan a ser descritos en el siglo XIX, destacando el médico escocés Thomas Trotter, pionero en la comprensión de los componentes físicos, sociales y mentales del alcoholismo. Trotter editó el que

sería el primer libro sobre el análisis de la embriaguez, asociándolo a un problema mental y, por tanto, englobándolo dentro del área médica.<sup>8</sup> Otros estudios llevados a cabo durante el siglo XIX, establecieron las bases clínicas y patológicas del abuso del alcohol, descubriendo y explicando sus efectos dañinos sobre el organismo y, llegando a ser ahora en nuestra época actual, uno de los problemas de salud más importantes a nivel global.

Los efectos deletéreos del consumo excesivo de alcohol y el conjunto de trastornos relacionados con el alcohol (TRA) son amplios, y comprenden cualquier enfermedad o problema social atribuible al consumo de bebidas alcohólicas. En su conjunto, el alcohol se asocia a más de 200 patologías, todas ellas con código CIE-10. Su efecto es global, afectando a diferentes órganos y sistemas. Desde el punto de vista neurológico, encontramos patologías como la degeneración cerebelosa o la encefalopatía de Wernicke. También encontramos afectación digestiva (gastritis, pancreatitis) y hepática (desde la simple esteatosis hasta la cirrosis, pasando por la hepatitis alcohólica y la hepatitis crónica). Existe un componente cardiovascular como pueden ser las arritmias cardíacas (como el *holiday heart syndrome*, típico tras un consumo exagerado y agudo de alcohol, conocido como *binge drinking* o *heavy episodic drinking [HED]*) o la miocardiopatía dilatada. Diferentes tipos de cáncer se asocian además con el consumo de alcohol (cáncer de boca, laríngeo, esofágico, hepático, entre otros).

Las consecuencias sociales y psiquiátricas del abuso del alcohol también se consideran dentro de los TRA. Destacan entre ellas, por su repercusión clínica, el síndrome de dependencia alcohólica, la psicosis alcohólica o el delirium tremens. El

abuso de alcohol también está ligado a situaciones de violencia de género o doméstica así como a trastornos de la conducta que pueden derivar en accidentes domésticos, laborales o de tráfico.<sup>9</sup> En estos casos, el consumo de alcohol no es más que la punta del iceberg en situaciones como el maltrato infantil o los accidentes de tráfico, en el que este consumo, es la base de este tipo de escenarios.<sup>10-11</sup>

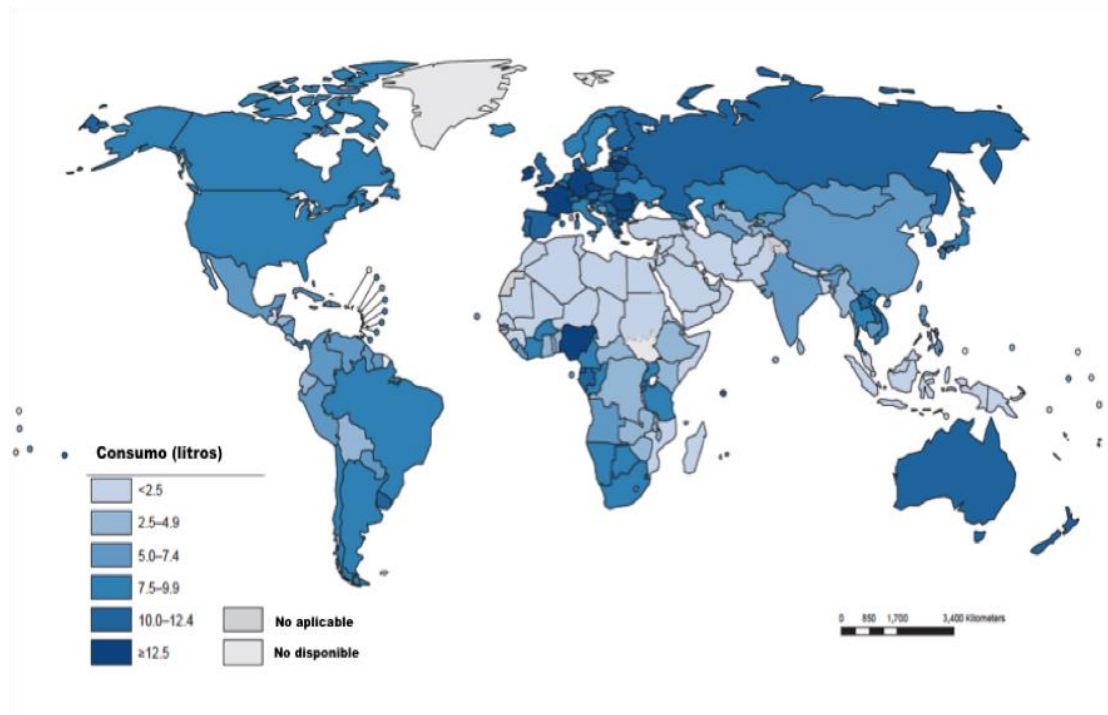
## **EPIDEMIOLOGÍA DEL CONSUMO DE ALCOHOL EN EL MUNDO**

El consumo excesivo de alcohol es la tercera causa de mortalidad en Estados Unidos con casi 88000 muertes al año. Los TRA suponen la pérdida de alrededor de 139 millones de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) de manera global. Los costes asociados a los mismos suponen, solo en Estados Unidos, alrededor de 200 mil millones de dólares anuales. Estos no solo están relacionados con gastos sanitarios, sino que comprenden también los gastos relacionados con el deterioro de la productividad laboral así como costes relacionados con accidentes de tráfico, lesiones y gastos legales. Asimismo, un estudio reciente con más de 40000 participantes realizado en Estados Unidos, muestra un aumento preocupante en el uso del alcohol en la última década, así como en el consumo considerado de alto riesgo y los TRA (de un 9% a un 13%). Este consumo de riesgo es especialmente relevante en mujeres, minorías raciales y mayores de 65 años, lo pone de relevancia un problema de salud pública que se prevé que vaya en aumento.<sup>12</sup>

El consumo de alcohol puro a nivel mundial se estima aproximadamente en 13,5 gramos de alcohol puro al día por persona mayor de 15 años. Sin embargo, prácticamente un cuarto del consumo del alcohol no está registrado, por lo que esta cifra, puede ser aún mayor.<sup>13</sup> Para describir las posibles situaciones de consumo de alcohol existen diferentes definiciones. El consumo de alcohol habitual suele utilizarse para aquellos sujetos que han consumido alcohol en los últimos 30 días. El *binge drinking* se refiere al consumo concentrado de cinco o más bebidas en un día en el último mes. Por último, el *heavy episodic drinking (HED)*, se describe como la toma de cinco o más bebidas durante cinco días consecutivos en los últimos 30 días, sin que estas dos últimas categorías sean excluyentes entre ellas.

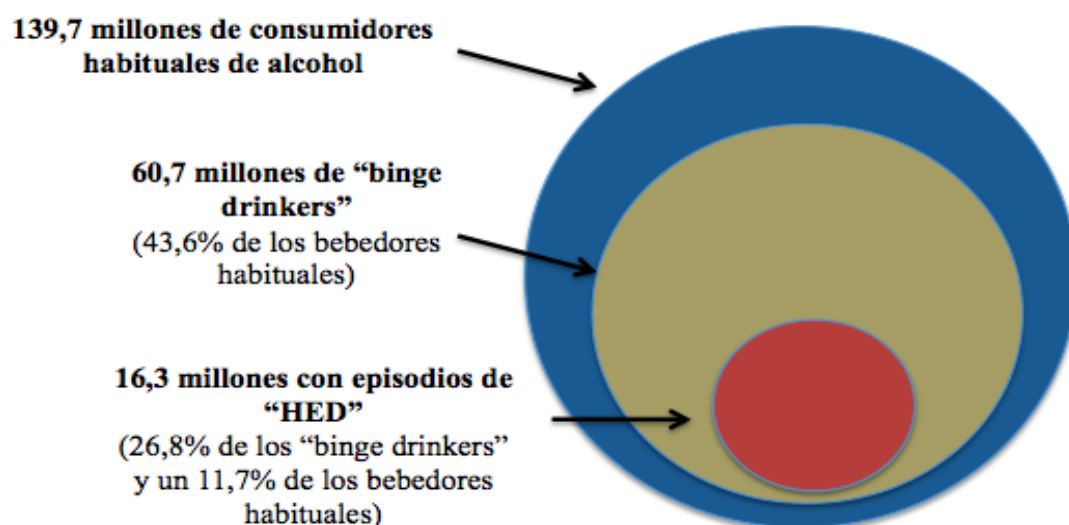
A nivel mundial, el consumo de alcohol varía en función de las diferentes regiones. Sin embargo, puede establecerse un mayor consumo de alcohol entre los países desarrollados. Así tenemos a Europa y América como los territorios con mayor consumo de alcohol, seguidos por África y, en menor medida, los países del Sudeste Asiático y el Mediterráneo Este. El tipo de bebida alcohólica varía también en función del territorio. De manera global, aproximadamente el 50% del alcohol consumido se realiza en forma de bebidas espirituosas. Mientras que el segundo lugar lo ocupa la cerveza con el 34,8% y el vino (8%).

Las diferencias culturales y sociales influyen en la edad de inicio del consumo de alcohol, así como el patrón de consumo. El Sudeste asiático y los países de la cuenca este del Mediterráneo son los que menor proporción de bebedores adolescentes y *binge drinking* reflejan. Sin embargo, los países europeos y americanos reflejan lo contrario. Los episodios de *binge drinking* y *HED*, son mucho más frecuentes y graves entre adolescentes menores de 15 años<sup>14-16</sup>



**Figura 1. Consumo total de alcohol *per capita* en mayores de 15 años.** Modificado de World Health Organization. Global Status Report on Alcohol and Health. World Health Organization; 2018.

En el caso de Estados Unidos, encontramos alrededor de 140 millones de bebedores habituales de alcohol. El 43,6% de los bebedores corrientes, entran en la definición de *binge drinkers*, mientras que un 26,8% de los mismos, son a su vez, personas con *HED*.<sup>17</sup>



**Figura 2. Consumo habitual, tipo *binge* y *HED* entre personas de 12 o más años en EEUU durante el año 2014.** Modificado de Hedden SL et al.<sup>17</sup>



## **El consumo de alcohol en España**

Dentro de la denominación utilizada por la OMS para dividir el mundo en diferentes regiones y así estudiar el uso del alcohol en las mismas, España entra dentro de la región europea. Como país de la cuenca mediterránea, el consumo de alcohol va unido a su cultura y dieta de manera tradicional. Casi la mitad del alcohol consumido en España se debe a la cerveza, mientras que el otro cincuenta por ciento se divide prácticamente a partes iguales entre el vino y los licores espirituosos.

Los datos de la OMS muestran que el consumo total de alcohol en España en 2016 se acerca a los 14,6 litros de etanol puro por habitante mayor de 15 años (más del doble estimado a nivel mundial). Esta cifra está por debajo de países vecinos como Portugal, Francia y Alemania (17,8, 16,7 y 16,9 litros respectivamente), pero por encima de otros como Italia (12 litros). El consumo de alcohol en varones casi triplica al de las mujeres en nuestro país, y hay el doble de mujeres que no consumen alcohol comparado con los varones. La prevalencia de personas que consumen más de 60 gramos de alcohol al día en mayores de 15 años se estima en un cuarto (25,6%) de la población bebedora, en la línea de países como Portugal pero inferior a la cifra de países como Francia y Alemania, en los que un tercio de la población bebedora consume más de 60 gramos al día. Esto hace que España se coloque como un país con un patrón de consumo de alcohol de bajo riesgo, con un menor consumo respecto a los años previos y con unas proyecciones estimadas de descenso del consumo de litros de alcohol puro por persona y año hasta llegar a aproximadamente 9 litros en 2025.<sup>18</sup>

La encuesta sobre alcohol y drogas en España (EDADES), con una muestra de alrededor de 21000 personas de edades comprendidas entre los 15 y 64 años en los años 2017 y 2018, refleja que la sustancia psicoactiva consumida en nuestro país de manera predominante es el alcohol. Éste ha sido probado en alguna ocasión por el 91,2% de la muestra poblacional. Atrás quedan otras sustancias como el tabaco (69,7%) y el cannabis, en tercer lugar (35,2%). La edad de inicio del consumo de alcohol en España se encuentra en los 16 años, a la par que la edad de inicio del consumo del tabaco. Esto las convierte en las drogas de inicio más temprano entre la población española. Se aprecia una ligera menor prevalencia en el sexo femenino, pero esta diferencia se está viendo reducida con el paso de los años.

La media nacional del consumo de alcohol en los últimos 30 días en España se sitúa en el 64,4%. Castilla y León se encuentra, junto con Castilla La Mancha, Cantabria y Extremadura, dentro de las Comunidades Autónomas con un consumo alrededor del 2% por debajo de la media nacional. A su vez, Castilla y León presenta un porcentaje menor de *binge drinking* en el último mes (13,3% respecto al 15,5% de la media nacional). El número de ingresos hospitalarios para tratamiento por abuso o dependencia de alcohol se mantiene estable en los últimos 10 años, con cifras que varían entre los 26000 y 28000 pacientes al año. Casi un quinto de los pacientes con abuso o dependencia de alcohol, admite consumo de otra droga aparte del alcohol, destacando esta última sustancia en el 90% de los policonsumos. Además, el consumo de alcohol (sobre todo si es de tipo intensivo o *binge drinking*), se asocia con una mayor prevalencia de consumo de otras drogas.

Dentro de las urgencias hospitalarias relacionadas con el uso y consumo de sustancias psicoactivas, el alcohol ocupa el segundo puesto por detrás de la cocaína (44,9% y 38,7% respectivamente). La edad media de esta parte de la población se encuentra en los 34,2 años y alrededor del 16% del total precisaron ingreso hospitalario. El alcohol supone la cuarta causa de muerte relacionada con la intoxicación aguda de sustancias psicoactivas detrás de los opioides, la cocaína y los hipnosedantes.<sup>19-20</sup>

Como hemos descrito anteriormente, el consumo de alcohol es una de las sustancias psicoactivas con un inicio de consumo más temprano. Con el objetivo de conocer la situación y tendencias de los consumos de drogas entre la población estudiante de enseñanza secundaria (entre los 14 y 18 años), los patrones de consumo y los factores de riesgo, en España se ha desarrollado, a través del Plan Nacional sobre Drogas, el programa ESTUDES (Encuesta sobre Uso de Drogas en Estudiantes de Enseñanzas Secundarias). Con una muestra cercana a 38000 sujetos, el estudio apunta de nuevo al alcohol como la droga legal más consumida (casi el 75% de la población joven), con una prevalencia casi dos veces y media superior a los del consumo del tabaco. El uso del alcohol es ligeramente superior en los varones, si bien la diferencia con las mujeres parece reducirse cada vez más o incluso se invierte en algunos indicadores. Prueba de ello es que sólo en el año 2018, el perfil del sujeto consumidor de alcohol es predominante femenino con un 52,3%. Aproximadamente el 2 % de los menores consume alcohol de manera diaria siendo los combinados (durante los fines de semana) y la cerveza (durante las jornadas de diario), el tipo de bebida más frecuentemente consumida.

El consumo de alcohol entre los jóvenes españoles de entre 14 y 18 años se mantiene estable desde el 2014, pero con un aumento en el consumo intensivo o *binge drinking* entre los 17 y 18 años. Alrededor del 50% de los estudiantes de entre 14 y 18 años admite haber realizado botellón en los últimos 12 meses, y un cuarto de ellos aproximadamente lo han hecho en el último mes. Datos parecidos se reflejan en la variable de las borracheras. Alrededor del 45% de los estudiantes reconocen haberse emborrachado en el último año, mientras que un cuarto se habría emborrachado en el último mes. Si bien aumenta la percepción de los jóvenes sobre el riesgo de consumo de alcohol, sobre todo en el sexo femenino, paradójicamente, el consumo de alcohol entre las mujeres jóvenes es un 3% superior al de los varones jóvenes.<sup>21-22</sup>

## **DAÑO ORGÁNICO INDUCIDO POR CONSUMO DE ALCOHOL**

El alcohol es capaz de inducir daño en diferentes tejidos y órganos. Entre los mecanismos principales por los que se produce esta lesión se encuentran; el aumento en el estrés oxidativo, alteraciones de la metilación, alteraciones en la respuesta inmune, modificaciones postraduccionales de proteínas, así como la desregulación del metabolismo de los lípidos y vías de transducción de señales que finalmente afectan a la función y supervivencia celular. El hígado es el órgano diana para los efectos perjudiciales del alcohol, ya que este es metabolizado principalmente por las células hepáticas, las cuales expresan altos niveles de dos enzimas oxidantes del alcohol; la alcohol deshidrogenasa y la CYP2E1. Sin embargo, otros órganos, como el cerebro, el intestino, el páncreas, los pulmones y el sistema inmunitario también se ven afectados por el alcohol. El alcohol también puede servir como un factor facilitador para la progresión de infecciones virales, enfermedades autoinmunes y cáncer.<sup>23-24</sup>

A continuación, revisaremos en detalle la patogenia de la enfermedad hepática alcohólica como expresión y paradigma del daño hepático en diferentes órganos.

### **Patogenia de la enfermedad hepática alcohólica**

La enfermedad hepática alcohólica (EHA) comprende un amplio espectro de patologías con daño hepático que van desde la simple esteatosis hasta la cirrosis hepática. Además, es bastante común encontrar en los pacientes con EHA otras comorbilidades que afectan también al hígado de manera preferente, como pueden ser las hepatitis virales o la esteatohepatitis no alcohólica.<sup>25</sup>

El consumo de alcohol se relaciona directamente con la aparición de EHA y cirrosis hepática. Sin embargo, es difícil establecer una dosis fija de consumo de alcohol o

límite a partir del cual, el consumo de alcohol conlleva enfermedad hepática. Como hemos comentado, son muchos los factores que influyen en el desarrollo de EHA (edad, sexo, patrón de consumo, etnia...). Un metanálisis, con revisión de hasta 17 diferentes estudios solo pudo encontrar indicios de los límites necesarios en el consumo de alcohol a partir del cual, podría ponerse en marcha el mecanismo de lesión hepatocelular. Sin embargo, sí que pudo concluir el mayor impacto del consumo de alcohol en la mortalidad y la morbilidad así como un mayor riesgo de desarrollar cirrosis hepática en mujeres que en hombres, ante una ingesta de alcohol similar.<sup>26-27</sup>

La EHA se suele clasificar a menudo en función de sus diferentes fases de evolución: esteatosis hepática, esteatohepatitis alcohólica, fibrosis, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. La esteatosis hepática se desarrolla en alrededor del 90% de los pacientes con un consumo de alcohol superior a los 60 gramos de alcohol al día. Esta patología habitualmente cursa de manera asintomática y puede ser reversible con la abstención del consumo de alcohol durante un periodo relativamente corto de tiempo. El desarrollo y evolución a la esteatohepatitis alcohólica no está bien aclarado. Diferentes series señalan que sólo un pequeño porcentaje de pacientes con esteatosis desarrollarán esteatohepatitis y que entre un 10 y un 20% de éstos terminarán desarrollando cirrosis. La evolución de la EHA hacia sus fases avanzadas no está completamente definida, si bien parecen existir una serie de factores genéticos y no genéticos, en el que la continuación del consumo de alcohol parece ser determinante.<sup>28-29</sup> Como veremos a continuación, el daño celular, la inflamación y el estrés oxidativo, son factores que contribuyen al daño hepático inducido por el alcohol.

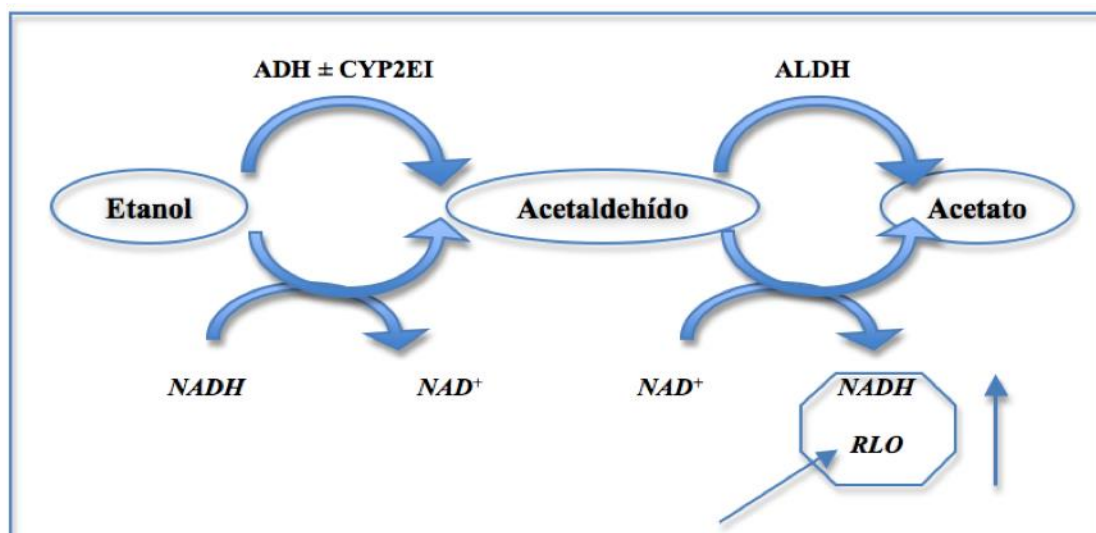
## **Efecto tóxico directo del etanol**

Al ingerir una bebida alcohólica, el alcohol que contiene la misma se absorbe en el estómago e intestino delgado. Si bien una pequeña porción del mismo se absorbe a través de la mucosa del primero, la mayor parte pasa al torrente sanguíneo a través de las paredes del segundo. Debido a su bajo peso molecular, no requiere un proceso de digestión y es absorbido directamente, alcanzando su concentración máxima en sangre entre los 30 y 90 minutos tras su ingesta. Su metabolización tiene lugar principalmente en el hígado, eliminándose aproximadamente un 10% del alcohol ingerido sin transformación directamente a través del aire espirado, el sudor y la orina. Diferentes factores influyen en la absorción y el metabolismo del alcohol (género, edad, etnia, peso corporal...). Como hemos comentado previamente, su principal metabolización se realiza en el hígado. La principal vía metabólica consiste en la oxidación del etanol en acetaldehído en el citosol del hepatocito. Este proceso se realiza gracias a la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), utilizando como cofactor a la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). La ADH se encuentra en su mayor parte en el tracto gastrointestinal y el hígado. Existen otras dos vías encargadas de la oxidación del etanol: las catalasas, cuyos niveles en el hígado son muy pequeños, y la oxidación a través del sistema oxidativo microsomal del retículo endoplásmico basada en el citocromo P450 y, más concretamente, en el CYP2E1. En condiciones normales, entre las dos apenas aportan el 10% de este proceso. Sin embargo, la CYP2E1 en particular, es “inducible por sustrato”, por lo que su actividad aumenta de manera exponencial con el consumo crónico de alcohol. La CYP2E1 se expresa en mayor cantidad en la zona perivenosa del hepatocito lo que vendría a explicar por qué la lesión hepática inducida por el alcohol es más frecuente en la zona centrilobular.<sup>30-31</sup>

El producto final de todas estas vías de metabolización es, por tanto, el acetaldehído, el cual es transformado en acetato a través de la aldehído deshidrogenasa (ALDH) localizada en el citoplasma y en las mitocondrias de las células hepáticas fundamentalmente. Esta reacción está catalizada por el sistema  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , provocando un desequilibrio resultante en una acumulación de  $\text{NADH}$ ,<sup>32</sup> el consumo de oxígeno necesario para llevar a cabo este proceso y la generación de radicales libres de oxígeno (RLO). El efecto tóxico directo del acetaldehído es uno de los responsables de la alteración en la permeabilidad gastrointestinal inducida por el etanol, lo cual conlleva un aumento de la concentración de endotoxina bacteriana (lipopolisacárido [LPS] de la pared celular de las bacterias gramnegativas) que accede a la circulación portal. Este aumento de concentración en los niveles plasmáticos de lipopolisacárido, activa a través del receptor 4 de tipo Toll (TLR4, *Toll-like receptor 4*), a las células del sistema monocito-macrófago (que incluye a las células de Kupffer hepáticas, los monocitos de sangre periférica y, posiblemente, la astrogliá cerebral), induciendo, como veremos más adelante, la secreción de citoquinas proinflamatorias.

Por último, dado que todo este complejo enzimático referido anteriormente (ADH; ALDH y CYP2E1) se encuentra en el hígado, la mayor parte del efecto tóxico directo de la ingesta de alcohol afecta a sus células.



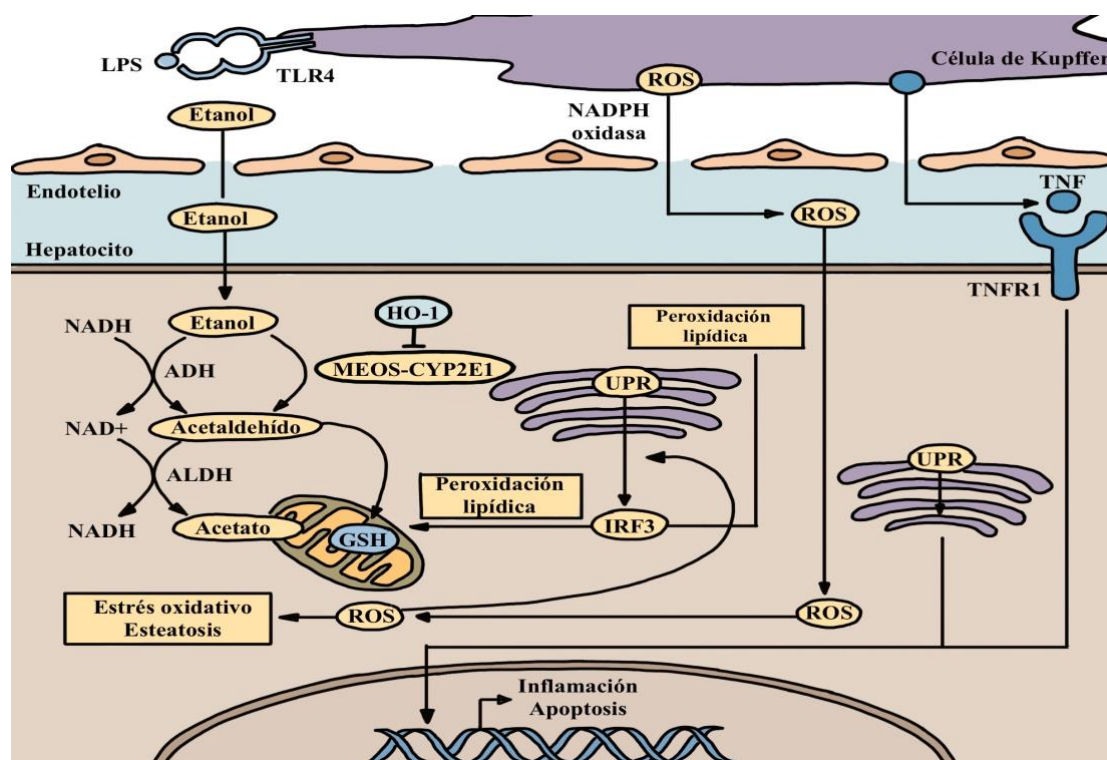


**Figura 3. Mecanismos directos e indirectos de la lesión hepática inducida por alcohol.** El metabolismo del alcohol produce la acumulación del metabolito tóxico acetaldehído. Por otro lado, la alteración del  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  produce una alteración del metabolismo celular, resultante en un aumento del consumo de oxígeno y de los radicales libres de oxígeno. **ADH:** Alcohol deshidrogenasa. **ALDH:** Aldehído deshidrogenasa. **CYP2E1:** Citocromo P450.  **$\text{NAD}^+$ :** Nicotinamida adenina dinucleótido. **RLO:** Radicales libres de oxígeno.

### Alteración del metabolismo celular e inducción del estrés oxidativo

Como hemos comentado, el metabolismo del etanol provoca una alteración del equilibrio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , con la consiguiente acumulación de este último. A su vez, conlleva un aumento del consumo de oxígeno, alterando el metabolismo energético celular y la capacidad de producir ATP así como provocando el aumento en las concentraciones de los RLO y de especies de oxígeno reactivo (EOR, o ROS por *reactive oxygen species*).<sup>33</sup> Estos radicales se unen al etanol o a átomos de hierro formando metabolitos como radicales hidroxilos (OH) u óxido ferroso (FeO), los cuales son responsables de la peroxidación liposomal de las membranas celulares. Las mitocondrias, el retículo endoplasmático (a través del CYP2E1) y las células de Kupffer (gracias a la NADPH oxidasa), son las principales fuentes de ROS. La importancia de esta última parte radica en que durante la lesión hepática inducida por el alcohol, el hierro está implicado en el estrés oxidativo, promoviendo la fibrosis a través de la catalización de la formación de ROS. Por otro lado, existen mecanismos

protectores frente a este estrés oxidativo. Uno de los más estudiados es la hemoxigenasa-1 (HO-1), la cual bloquea la actividad de la CYP2E1 reduciendo la generación de ROS.<sup>34</sup> El efecto citotóxico del metabolismo del alcohol provoca la muerte celular mediante mecanismos de apoptosis y necrosis. Existe evidencia de la existencia de patrones moleculares asociados al daño (DAMP, en su abreviatura del inglés *damage-associated molecular pattern*), que se liberan tras la muerte celular, provocando la activación de neutrófilos y macrófagos, la fibrogénesis y la regeneración hepática. Por último, el factor 3 regulador del interferón (IRF-3), conecta el estrés oxidativo con la mitocondria, provocando la subsiguiente apoptosis del hepatocito a través de la activación de las caspasas pero también provocando inflamación hepática a través de las células mononucleadas estimuladas por las vías del interferón y el NF- $\kappa$ B.<sup>35</sup> Estos mecanismos se describen en la figura 4.



**Figura 4. Efecto citotóxico del metabolismo del alcohol.** Modificado de Louvet A, et al.<sup>31</sup> **ADH:** Alcohol deshidrogenasa. **ALDH:** Aldehído deshidrogenasa. **CYP2E1:** Citocromo P450 2E1. **ER:** Retículo endoplasmático. **GSH:** Glutathión reducido. **HO-1:** Hemoxigenasa-1. **IRF3:** Factor 3 regulador de interferón. **LPS:** Lipopolisacárido. **MEOS:** Sistema de oxidación microsomal del etanol. **NAD:** Nicotinamida adenina dinucleótido. **ROS:** Especies reactivas de oxígeno. **TNFR1:** Receptor del factor de necrosis tumoral 1. **TLR-4:** Receptor *Toll-like* 4. **UPR:** Respuesta a proteínas desplegadas.

## **Alteración del sistema inmune innato**

Dentro de la respuesta inmune innata, cabe destacar el papel de los neutrófilos, células dendríticas y células *natural killer*. Los neutrófilos son células que son rápidamente reclutados en las zonas de infección o lesión. Una vez activados, pueden fagocitar patógenos, secretan diferentes citoquinas inflamatorias y forman las llamadas trampas extracelulares de neutrófilos<sup>36-37</sup> (NETs, derivada de su acrónimo en inglés, *neutrophil extracellular traps*).

Las células dendríticas también forman parte de la inmunidad innata fagocitando patógenos así como la producción de interferón tipo I en respuesta a infecciones virales. Sin embargo, su función principal es la de presentar antígenos a las células T de los ganglios linfáticos. El consumo crónico de alcohol origina un descenso en las células dendríticas circulantes así como alteraciones en su diferenciación. Sin embargo, otros estudios no muestran una disminución en la producción de las citoquinas proinflamatorias respecto a los controles mientras que otros incluso encuentran un aumento de las mismas.<sup>38-39</sup>

Por último, las células *natural killer* (NK) juegan un papel fundamental en el reconocimiento y eliminación de células infectadas o alteradas. La ingesta continuada de alcohol, provoca una disminución de la producción de granzimas y perforinas, así como de su citotoxicidad y de la inmunovigilancia frente al cáncer.<sup>40-41</sup>

## **Hepatopatía alcohólica, disbiosis y sistema inmune**

Como hemos comentado anteriormente, el principal componente de la enfermedad hepática alcohólica (EHA) es la inflamación. La translocación bacteriana juega un papel importante en este último punto, probablemente debido a que el alcohol parece

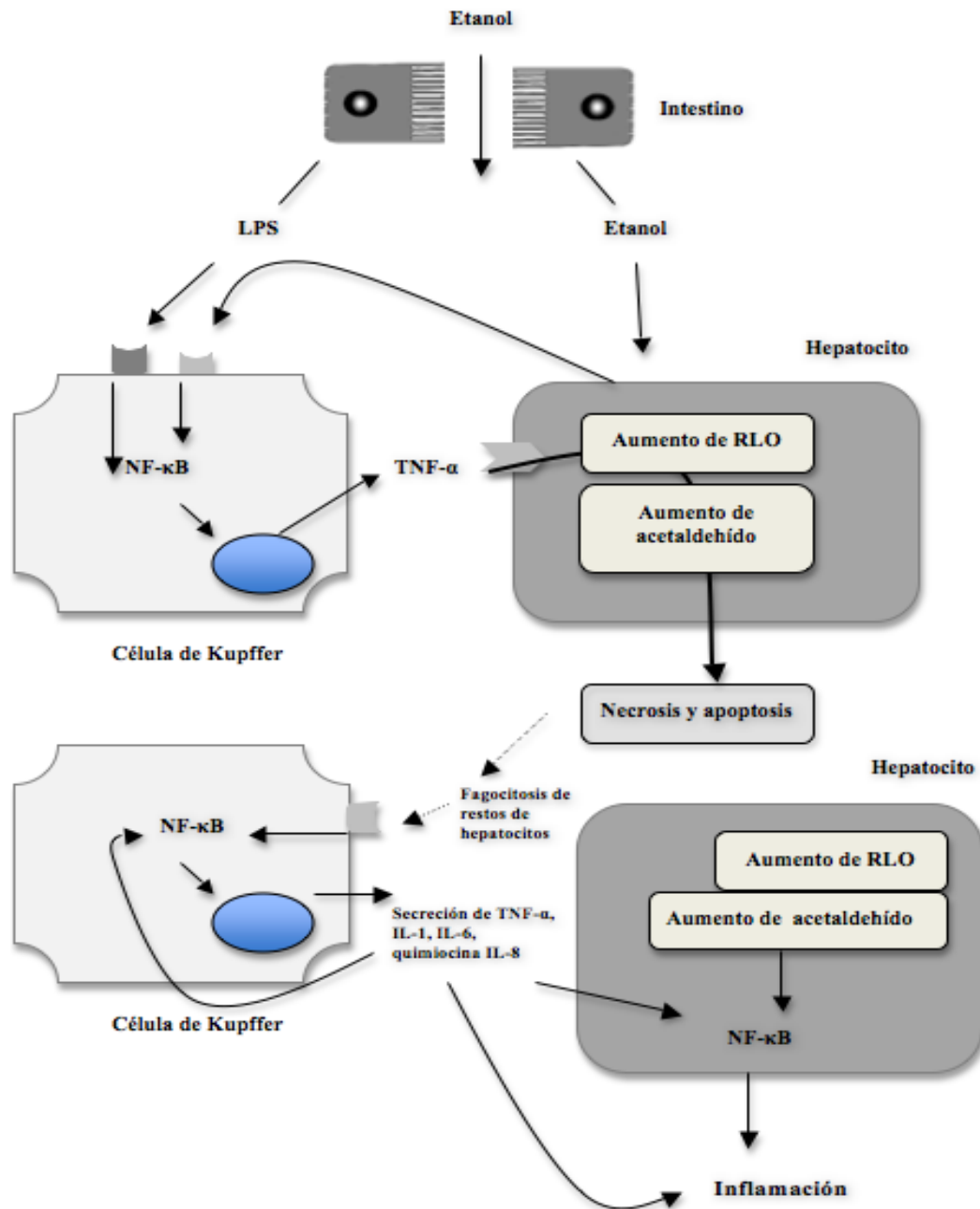
provocar una alteración de la barrera intestinal que, combinada con un aumento de la permeabilidad microvascular, provocan un aumento de los niveles sanguíneos de lipopolisacárido (LPS) y ADN bacteriano.<sup>42-44</sup> El LPS es una endotoxina que al unirse a los receptores *Toll-like* (TLR4, es capaz de provocar inflamación debido a la activación del sistema de citoquinas proinflamatorias a través de la vía del factor nuclear kappa B (NF-κB), habiéndose demostrado que la gravedad de la lesión hepática se correlaciona de manera lineal con su concentración en sangre.<sup>45-47</sup> Tras la unión del LPS a los receptores TLR4, se produce la activación de las células de Kupffer, en la cual están implicadas tanto el NF-κB como proteínas quinasas activadas por mitógenos. Una vez activadas, las células de Kupffer secretan ROS, quimioquinas IL-8 y CCL2, (también conocidas como “citoquinas quimiotácticas”). Son proteínas de tamaño pequeño y bajo peso molecular (8 a 14 kDa) pertenecientes a la familia de las citoquinas. Se llaman de este modo debido a que inicialmente fueron identificadas por su capacidad de activar, atraer y dirigir diversas familias de leucocitos circulantes hacia los sitios dañados, así como citoquinas proinflamatorias tales como factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), IL-1 e IL-6. Sin embargo, la activación de las células de Kupffer no solo tiene un efecto deletéreo, pues éstas pueden adoptar un fenotipo antiinflamatorio a través de la liberación de IL-10.<sup>48</sup>

El alcohol provoca diferentes alteraciones en el sistema inmune, y si bien se ha asociado de manera clásica con un estado de inmunodeficiencia<sup>49</sup>, como podemos observar, su consumo se asocia a una activación del sistema inmune que conlleva al desarrollo de la lesión hepática.<sup>50-53</sup>

Como se ha mencionado previamente, la activación de las células de Kupffer son un elemento clave en la lesión hepática inducida por el consumo de alcohol, condicionando su activación la secreción de citoquinas proinflamatorias tales como la IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , así como de quimioquinas como la IL-8. La secreción del TNF- $\alpha$  se lleva a cabo a través de la activación por el NF- $\kappa$ B, el cual se sintetiza como respuesta al LPS, al exceso de RLO y a la acumulación de acetaldehído procedentes del metabolismo del etanol en la célula de Kupffer y en los hepatocitos cercanos, como se muestra en la figura 5.

El TNF- $\alpha$  se sintetiza principalmente por monocitos y macrófagos activados. En el hígado, sólo las células de Kupffer son capaces de producirlo y sus niveles se han relacionado de manera directa con la hepatopatía alcohólica desde el momento que produce lesión y muerte celular.<sup>54-56</sup> Además, la inflamación hepática se ve perpetuada por la muerte de los hepatocitos ya que la fagocitosis de los restos celulares por parte de las células de Kupffer, promueve de nuevo la síntesis del NF- $\kappa$ B, actuando de retroalimentación positiva y con la consiguiente nueva liberación de mediadores de la inflamación. Tanto la presencia del etanol como el TNF- $\alpha$  activan el NF- $\kappa$ B. Sin embargo, otros factores hepatotóxicos (como la sobrecarga férrica o la disbiosis que provocan el consumo crónico de alcohol) también colaboran en la síntesis del NF- $\kappa$ B hepatocitario. Destacar que el NF- $\kappa$ B no es un factor de transcripción que codifique solamente al propio TNF- $\alpha$  así como otras citoquinas inflamatorias, sino que también está implicado en la codificación de ciertos inhibidores de la apoptosis, como las proteínas IAP y Bcl-XL, las cuales ejercerían por tanto, un efecto citoprotector. Por lo tanto, la muerte y destrucción celular, se verían condicionadas por el equilibrio entre diferentes mecanismos que promueven o

frenan la muerte celular, en el cual, el etanol parece romper el equilibrio a favor del primero.



**Figura 5. Mecanismos de muerte celular e inflamación hepática.** El lipopolisacárido (LPS) provoca la síntesis de  $\text{TNF-}\alpha$  a través de la activación del  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , actuando sobre los hepatocitos sensibilizados por el acúmulo de radicales libres de oxígeno (RLO) y acetaldehído derivado del metabolismo del etanol. Todo ello induce la síntesis de citoquinas proinflamatorias. El  $\text{TNF-}\alpha$  secretado provoca lesión y muerte celular (necrosis y apoptosis). La secreción de citoquinas proinflamatorias, la fagocitosis de los restos hepatocitarios así como el efecto de los RLO y el acetaldehído, inducen la inflamación (Modificado de Laso FJ, et al.<sup>57</sup>).

Como podemos observar, la hepatopatía alcohólica tiene su origen en una activación inflamatoria llevada a cabo mayoritariamente por las células de Kupffer. Esta activación, junto con el metabolismo del alcohol en los hepatocitos, genera una cascada inflamatoria que no sólo conlleva a la necrosis y apoptosis de los hepatocitos con la consecuente lesión hepática, sino que, perpetúa esta inflamación debido a la acumulación de los productos resultantes del metabolismo del alcohol y la fagocitosis de los restos hepatocitarios. Por otro lado, comprobamos que el consumo crónico de alcohol supone una alteración en la respuesta inmune innata llevada a cabo por neutrófilos, células dendríticas y células NK. Este equilibrio en la respuesta inflamatoria, se ve alterado por el consumo de alcohol, provocando un estado de activación inflamatoria que, ante un estímulo externo en forma de infección, puede que responda con una disminución en la producción de citoquinas así como de la capacidad fagocítica y bactericida.

En cualquier caso, la escasa evidencia disponible parece indicar que existe una alteración paradójica de la respuesta inmune; inicialmente con activación pro-inflamatoria, que se vería perpetuada por los mecanismos previamente descritos, pero además con una de una fase inmunosupresora, la cual parece suceder de manera subclínica, pero que puede ser relevante ante una infección o daño tisular.<sup>53,58</sup>

#### *Alteración del sistema inmune adquirido*

Como ya hemos comentado previamente, las células que componen el sistema inmune innato tienen, entre otras funciones, la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. Además de ello, las células dendríticas y los macrófagos añaden como función la presentación de antígenos a las células del sistema inmune específico. Estas células incluyen a los linfocitos B, linfocitos T y las células T *natural killer* (las cuales

comparten propiedades con las células NK del sistema inmune innato y los linfocitos T del sistema inmune adquirido). El papel del sistema inmune adquirido en la EHA ha sido ampliamente estudiado, destacando el papel de los linfocitos T en su patogenia y desarrollo.<sup>59-62</sup> Los linfocitos T pueden diferenciarse en linfocitos T *helper* o colaboradores (también conocidos como CD4<sup>+</sup>), linfocitos T citotóxicos o CD8<sup>+</sup>, linfocitos Th 17 y linfocitos T reguladores.

Los linfocitos Th 17 son un subtipo de linfocitos T colaboradores encargados de producir IL-17 además de servir como los principales defensores de las barreras epiteliales y mucosas. Los linfocitos T reguladores, son los encargados de suprimir la posible respuesta inmune frente ante autoantígenos, así como de controlar y limitar la respuesta inmune.

En función del tipo de citoquinas que produzcan, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o colaboradores, se diferencian en células Th1 o Th2. La función de las células Th1 consiste en iniciar la respuesta inmune específica con la activación de macrófagos y células T citotóxicas. Las células Th2, se encargan de iniciar una respuesta humoral para responder contra patógenos extracelulares mediada por diferentes proteínas como las inmunoglobulinas, producidas por las células B. Además, pueden secretar diferentes interleucinas, algunas de las cuales tienen un efecto antiinflamatorio.

El consumo crónico de alcohol parece favorecer un patrón de secreción de citoquinas por parte de los linfocitos Th1 (como la IL-2 o el INF- $\gamma$ ). Éste probablemente se encuentre inducido por un aumento de la IL-12, la cual es secretada a su vez por las células de Kupffer, estimulada por el lipopolisacárido. Este aumento de citoquinas de patrón Th1 junto con la IL-12, favorece la activación y proliferación de los linfocitos T citotóxicos, los cuales son inductores de la apoptosis celular y la necrosis



hepatocitaria, así como perpetuadores del estado inflamatorio. El etanol también colabora en la activación y función final de los linfocitos T citotóxicos<sup>63-65</sup>. Incluso se ha demostrado que su efecto directo puede conducir a la formación de clones autorreactivos de linfocitos T citotóxicos sobre las células hepáticas.<sup>66-67</sup> La activación de estos linfocitos se realizaría por dos vías: directa e indirecta. Por un lado, el etanol promueve la expresión directa de moléculas del sistema HLA. Por otro, la acción inmunógena del lipopolisacárido así como de los productos derivados del metabolismo del alcohol, los cuales actuarían a modo de antígenos, así como la expresión con las moléculas HLA de clase I atraerían a los linfocitos citotóxicos, provocando la consiguiente muerte celular por apoptosis.

Este equilibrio entre linfocitos Th1 y Th2, así como su patrón de citoquinas, viene determinado por el consumo crónico de alcohol. Como se ha explicado anteriormente, este consumo crónico es capaz de inclinar la balanza hacia un patrón de Th1, el cual favorece el aumento de los linfocitos T citotóxicos circulantes y activados, con la consecuente lesión hepática y perpetuación de la inflamación. A su vez, es capaz de mantener niveles elevados de Th 17 respecto a controles sanos en diferentes estudios, así como de interferir de manera negativa en la actuación de los linfocitos T reguladores.<sup>68</sup>

Por último, la respuesta inmune adquirida también es llevada a cabo a través de los linfocitos B y las células dendríticas. Los linfocitos B se caracterizan por la producción de inmunoglobulinas. A diferencia de los linfocitos T, sólo necesitan reconocer los antígenos propios, ya que no dependen de la interacción directa con los complejos de histocompatibilidad HLA. El paso del linfocito B maduro a célula plasmática supone el paso final para la producción de inmunoglobulinas. Además del

resto de efectos sobre el sistema inmune, el consumo crónico de alcohol es capaz de producir una disminución del número de linfocitos B circulantes así como de su capacidad presentadora de antígenos, disminuir el número total de células plasmáticas y disminuir la producción de inmunoglobulinas (salvo de inmunoglobulina A), alterando la respuesta inmune mediadas por células dependientes de anticuerpos.

### **Daño inducido por alcohol en el sistema nervioso central**

El abuso de alcohol puede provocar alteraciones en la función y morfología de las neuronas, así como un descenso de la masa neuronal total en diferentes lugares del cerebro.<sup>69</sup> El consumo agudo de alcohol o los episodios de *binge drinking*, han demostrado que producen no solo una alteración de la estructura neuronal sino que contribuyen al proceso de neurodegeneración. Si bien los mecanismos que producen este hecho no se conocen con certeza, se cree que el edema cerebral y la inflamación glial son parte fundamental de este proceso.<sup>70-71</sup>

La inflamación o tumefacción glial así como la astrogliosis o astrocitosis reactiva (aumento anormal en el número de astrocitos debido a la destrucción de las neuronas próximas por diferentes causas [infección, trauma, isquemia...]), es la respuesta habitual de los astrocitos a la inflamación o trauma. Los astrocitos son los encargados de mantener la homeostasis iónica, regular el metabolismo energético y la transmisión sináptica. Sin embargo, también funcionan como células del sistema inmune, actuando como mediadores de la respuesta inmunitaria innata en el sistema nervioso central (SNC). La estimulación de los astrocitos por parte del alcohol provoca, al igual que en las células hepáticas, un aumento de los radicales libres, citoquinas y otros mediadores de la inflamación como la cicloxigenasa 2 (COX-2) o la óxido

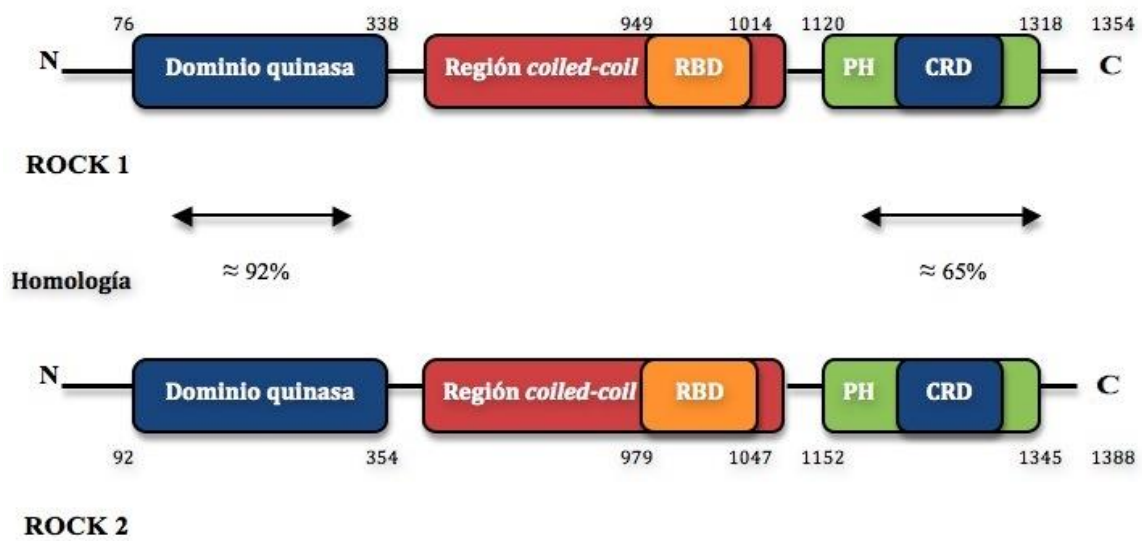
nítrico sintasa inducible (iNOS, del inglés, *inducible nitric oxide synthase*). Ambos mediadores se encuentran regulados por el factor nuclear kappa B (NF-κB) y, en el caso del SNC, están implicados en diferentes procesos neurodegenerativos.<sup>72-73</sup>

Blanco et al,<sup>74</sup> consiguieron demostrar en modelos murinos cómo tratamientos de muestras de astrocitos con etanol provocaban un aumento del NF-κB ya desde el minuto 30 de la intoxicación, condicionando a su vez un aumento tanto de la COX-2 como de la iNOS. A su vez, demostraron que el bloqueo del NF-κB, suponía un descenso de los niveles de ambas citoquinas, por lo que ha sido uno de los primeros trabajos en demostrar el papel del NF-κB en la neurodegeneración ligada al consumo excesivo de alcohol. Trabajos posteriores señalan que la intoxicación de astrocitos con etanol a concentraciones de 100 mM durante 24 horas, provocaban una reducción de la viabilidad celular, una modificación de las señales inflamatorias implicadas en la neuroinflamación así como la elevación significativa de los niveles máximos tanto de NF-κB como de COX-2 e iNOS.<sup>75-76</sup> Por otro lado, tanto en modelos murinos como humanos, se ha observado un aumento de la densidad de astrocitos y la normalización de dicho estado proinflamatorio posteriores a un periodo de abstinencia de alcohol (en ocasiones, tan precoz como una abstinencia de 24 horas en bebedores habituales)<sup>77-78</sup>

## **LAS RHO-QUINASAS Y SU PAPEL EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA**

Las proteínas ROCK (del inglés *rho-associated coiled-coil containing kinases*) o rho-quinasas, son unas proteínas efectoras de la familia Rho GTPasas, pertenecientes a su vez a la familia ACG de las serina/treonina quinasas. El grupo de las serina/treonina quinasas incluye más de 60 proteínas quinasas en el genoma humano, clasificadas en 14 familias. Dentro de esta familia, las rho-quinasas se han descrito como proteínas que juegan un papel central en la organización del citoesqueleto de actina de las células, participando en acciones tales como la contracción celular, apoptosis y proliferación de las mismas.<sup>79</sup> Sin embargo, su estudio posterior ha hecho que el interés en las mismas vaya aumentando al demostrarse, como veremos más adelante, su papel en enfermedades cardiovasculares y autoinmunes, así como su intervención en diferentes pasos ligados a la inflamación.<sup>80-85</sup>

En humanos, se identifican dos isoformas, la ROCK1 y la ROCK2. Ambas contienen 33 exones y se encuentran localizadas en los cromosomas 18 y 2 respectivamente. Una y otra isoformas son muy parecidas, compartiendo el 65% de su secuencia de aminoácidos y aproximadamente el 92% en su dominios quinasas. ROCK1 parece expresarse de manera más abundante en las células del sistema inmune, mientras que ROCK2, se expresa en mayor medida en el músculo cardíaco y vascular.

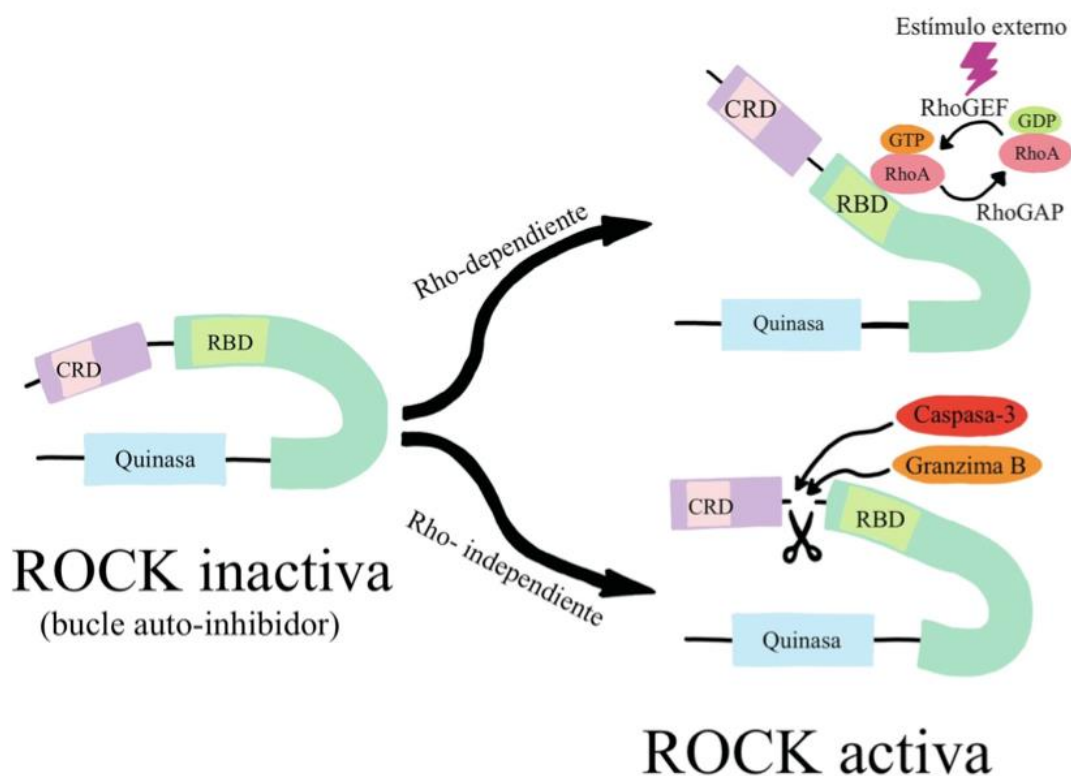


**Figura 6. Dominios funcionales de las proteínas humanas ROCK1 (NP\_005397.1) y ROCK2 (NP\_005397.1).** Modificado de Julian L, et al.<sup>86</sup> **CRD:** *C-terminal cysteine rich domain*. **PH:** dominio de homología a pleckstrina. **RBD:** *ROCK binding domain*.

El dominio ROCK se localiza en la región N-terminal, seguida de una hélice de unos 600 aminoácidos aproximadamente. Dentro de ella existe un dominio con homología a la pleckstrina (PH) y una zona RBD (del inglés *rho binding domain*), que constituye la zona de unión exclusiva de la molécula guanósín trifosfato (GTP) a las rho-quinasas, la cual produce su activación.

La activación de las rho-quinasas puede realizarse de dos maneras, dependiente o independiente de las propias rho-quinasas. La activación convencional consiste en la activación rho-quinasa dependiente mediante un estímulo externo. El extremo carboxi-terminal de la ROCK, actúa como una región autoinhibitoria del extremo amino-terminal, conformando una estructura proteica plegada sobre sí misma. La delección del extremo carboxi-terminal, supone la activación de la proteína. Como en otras GTPasas de la familia de las Rho, RhoA se activa gracias a la proteína RhoGEF

(la cual consiste en un dominio estructural de factores de intercambio de nucleótidos de guanina). Este complejo activado, se une con el dominio RBD de la ROCK, induce un cambio conformacional desplegando la proteína y separa ambos extremos terminales, por lo que se interrumpe la inhibición de este extremo carboxi-terminal sobre el dominio quinasa.



**Figura 7. Modos de activación de las rho-quinasas.** En su modo inactivo, la rho-quinasa forma un bucle sobre sí misma, de modo que el extremo carboxi-terminal actúa de inhibidor. La unión de la GTP, provoca un cambio conformacional que supone la activación de la proteína. En el contexto de la apoptosis, estas proteínas se activan de manera independiente a la propia rho-quinasa gracias a las caspasas y la granzima B, las cuales provocan una escisión de extremo carboxi-terminal inhibidor. Modificado de Shimizu T, et al.<sup>80</sup> **CRD:** *C-terminal cysteine rich domain*. **GDP:** Guanosín bifosfato. **GTP:** Guanosín trifosfato. **RBD:** *ROCK binding domain*. **RhoGEF:** Factor intercambiador de la Rho guanina nucleotido. **RhoGAP:** Proteína activadora de la Rho GTPasa.

Sin embargo, en el contexto de la apoptosis, las rho-quinasas pueden activarse mediante la acción de caspasas en el caso de las ROCK1, provocando la escisión del extremo carboxi-terminal inhibidor o bien mediante la granzima B en el caso de la ROCK2, lo que conlleva a su vez una activación de las caspasas así como de la

ROCK1. Destacar que la función principal de la granzima B consiste en inducir la muerte celular para eliminar las células infectadas con virus y células tumorales.

Aunque las proteínas Rho activan de manera habitual a las ROCK, existen otras proteínas ligandos de GTP que han demostrado regular de manera negativa la activación de estas proteínas. Así, moléculas como la Rad1 o la Coronina1B se unirían al dominio PH de las ROCK, atenuando su activación.<sup>87-88</sup>

La distribución de las ROCK es ubicua en todas las células del organismos. Como hemos comentado previamente, la isoforma ROCK1 parece expresarse con mayor fuerza en las células del sistema inmune mientras que la ROCK2 lo hace en las células del músculo cardíaco y vascular. Sus funciones descritas por primera vez, hacían mayor hincapié en clasificarlas como proteínas estructurales, con un papel importante en la conformación del citoesqueleto de actina-miosina, a través del cual actuarían en diferentes eventos morfológicos durante la fase de la apoptosis celular.<sup>89</sup>

Sin embargo, estudios posteriores comenzaron a descubrir que la actividad de las rho-quinasas está implicada en múltiples procesos fisiológicos y, por tanto, en la fisiopatología de diversas enfermedades. Curiosamente, este conocimiento ha ido unido a la posibilidad de inhibición de estas moléculas, por lo que los ensayos con inhibidores farmacológicos de las ROCK han sido de gran utilidad para el conocimiento de las vías moleculares intrínsecas en las que están implicadas las rho-quinasas.<sup>90-92</sup> El fasudil,<sup>93</sup> es la única molécula inhibidora de las ROCK aprobada para uso humano. Este fármaco es un inhibidor no selectivo de las dos isoformas de las rho-quinasas (debido a la alta similitud entre ambas), cuyos primeros usos en humanos se realizaron en Japón, en el tratamiento del vasoespasma asociado tras una

hemorragia subaracnoidea.<sup>94</sup> Desde entonces, el uso de inhibidores de las ROCK ha contribuido de manera significativa al conocimiento de la biología de las rho-quinasas.

A partir de aquí, los primeros estudios se centraron en el rol de estas proteínas en la patología cardiovascular, más concretamente, en el remodelado y fibrosis cardíaca.<sup>80, 95-96.</sup> Asimismo, las proteínas ROCK también intervienen en otros procesos como el vasoespasmo, ya comentado anteriormente, la arterioesclerosis y la hipertensión.<sup>97-98</sup> Por otro lado, también hay estudios que han demostrado el papel de las rho-quinasas en el metabolismo de los hidratos de carbono, disminuyendo la resistencia a la insulina con su inhibición<sup>99</sup>; así como otros muestran su implicación en las enfermedades autoinmunes<sup>100</sup> o su posible papel en el cáncer como oncogén.<sup>101-102</sup>

### **Las rho-quinasas y la respuesta inflamatoria ligada al NF-κB**

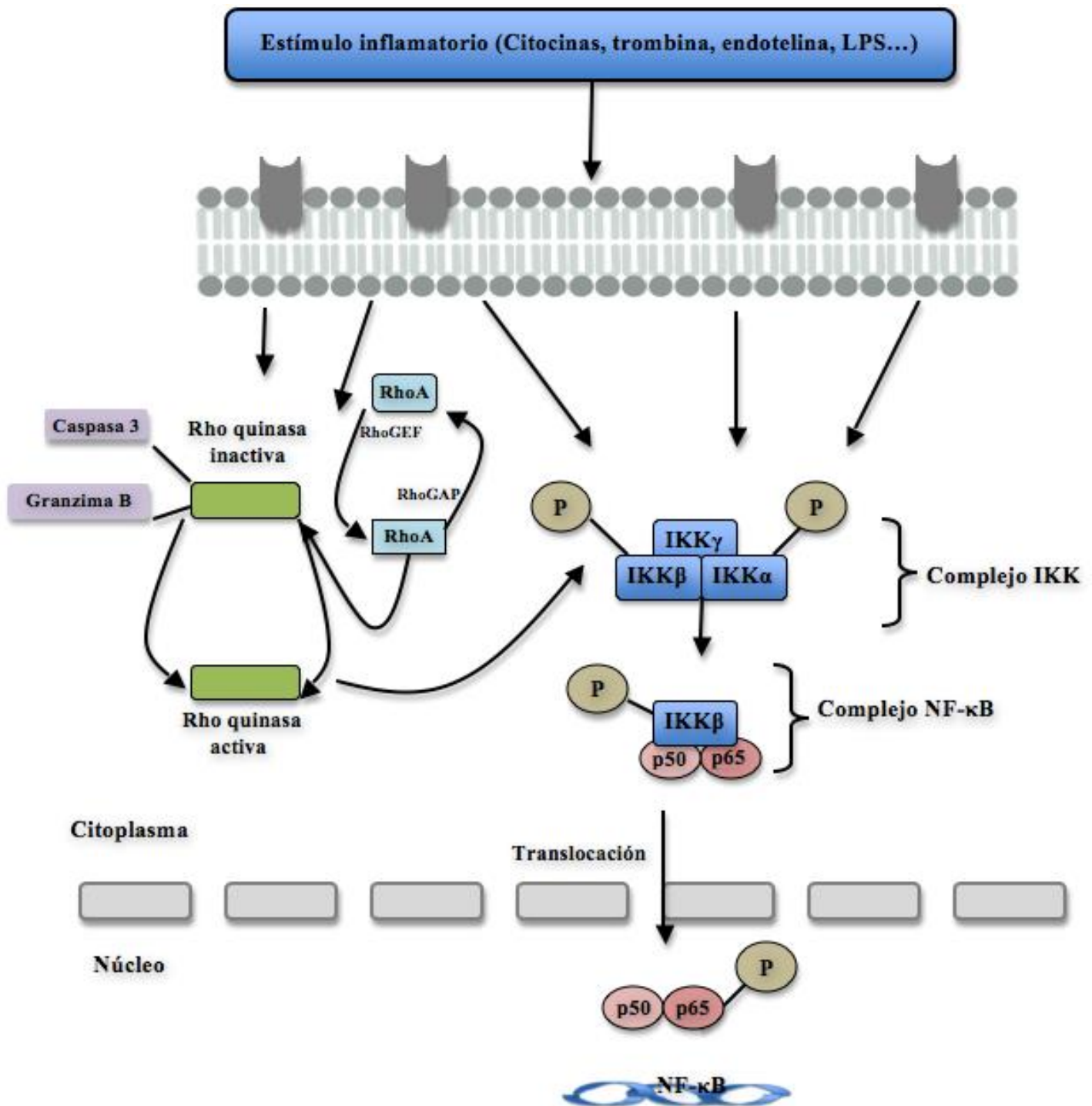
Este papel pleiotrópico de las rho-quinasas ha permitido plantear también su asociación con la activación de la inflamación y fibrosis a través de la vía del NF-κB. Como se ha comentado previamente, el NF-κB es una pieza clave de la respuesta inflamatoria, considerándose como el principal mediador en múltiples patologías relacionadas con la inflamación. En el caso de la hepatopatía alcohólica, tanto la presencia del etanol como el TNF-α (sintetizado principalmente por monocitos y macrófagos activados y, en el caso del hígado, por las células de Kupffer), activan el NF-κB. Además, como se ha explicado anteriormente, la apoptosis de los hepatocitos y la posterior fagocitosis de los restos celulares por las células de Kupffer, promueve de nuevo la síntesis del NF-κB, actuando de retroalimentación positiva.



La activación del NF- $\kappa$ B se inicia ante la presencia de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), los TLR o el lipopolisacárido, así como otros estímulos. Esta vía, depende a su vez de la activación del IKK $\beta$ . El IKK $\beta$  es una quinasa de la familia IKK [(del inglés, *inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase* (IkB)], la cual se encarga de fosforilar inhibidores del NF- $\kappa$ B, lo que conlleva a su disociación del NF- $\kappa$ B, permitiendo que este último se trasloque al núcleo para estimular la transcripción de genes proinflamatorios.

La activación del NF- $\kappa$ B mediante las ROCK se realiza a través de dos mecanismos: la fosforilación del inhibidor de NF- $\kappa$ B (IkB $\alpha$ /NFKBIA), y la fosforilación de la RelA/p65 NF- $\kappa$ B.<sup>103-105</sup>

El estímulo inflamatorio activa diferentes señales de transducción las cuales inducen la activación del complejo IKK. Esto resulta en la fosforilación de las proteínas IkB y su posterior degradación por proteosomas. De esta manera, los dímeros de NF- $\kappa$ B se traslocan al núcleo celular para luego activar la transcripción de genes inflamatorios. La activación de las Rho quinasas (vía dependiente o independiente de las Rho), participan en esta activación del NF- $\kappa$ B a través de la fosforilación del inhibidor de NF- $\kappa$ B y la fosforilación de la RelA/p65 NF- $\kappa$ B.



**Figura 8. Señalización celular en la activación del NF-κB (Modelo simplificado).** El estímulo inflamatorio activa diferentes señales de transducción que activan el complejo IKK, lo que conlleva finalmente a la traslocación de los dímeros de NF-κB al núcleo celular. Adaptado de Alberts B, et al.<sup>106</sup>  
**IKK:** Inhibidor de la NF-κB quinasa. **RhoGEF:** Factor intercambiador de la Rho guanina nucleotido.  
**RhoGAP:** Proteína activadora de la Rho GTPasa.

## **Las rho-quinasas y la respuesta inflamatoria inducida por el alcohol**

Como se ha descrito previamente, existen datos para creer que las rho-quinasas se encuentran implicadas en la activación del proceso inflamatorio a través de la vía del NF- $\kappa$ B, y, en el caso del hígado, la inflamación, daño y posterior fibrosis hepática. Por otro lado, entre las funciones de estas proteínas se encuentra la organización del citoesqueleto de actina de las células, participando en las diferentes actividades como la contracción celular o la apoptosis. En el caso del sistema nervioso central, y más concretamente en los astrocitos, puede darse una forma de apoptosis denominada anoikis, la cual se produce por la pérdida de la matriz extracelular. El alcohol es un tóxico que no sólo condiciona y perpetúa un aumento del estado inflamatorio sino que además, provoca alteraciones morfológicas celulares en los astrocitos que conllevan a la apoptosis. Estos cambios morfológicos se caracterizan por el desacoplamiento del citoesqueleto de la membrana plasmática, degradando la estructura interna de la célula, y condicionando la flexibilidad necesaria para que la célula se separe en pequeñas burbujas individuales o bolsas de la matriz intercelular (*blebbing*, en inglés), así como la condensación de la cromatina.<sup>107-109</sup>

Este proceso de *blebbing* es generado por el citoesqueleto celular, por lo que la actividad de las rho-quinasas juega un papel fundamental en el mismo. Miñambres et al,<sup>110</sup> demostraron que la intoxicación con etanol *in vitro* de astrocitos, aumentaba de manera significativa la población sub-G0/G1 (población que representa las células apoptóticas) así como provocaba una alteración morfológica de su membrana celular tipo *blebbing* la cual, como hemos comentado, se sigue de la fragmentación del núcleo celular y la condensación de la cromatina, los cuales son eventos característicos de la fase final de la apoptosis. Una vez comprobada esta alteración,

buscaron justificar si las rho-quinasas, como parte de la organización del citoesqueleto, tenían relación en este proceso. Ya estudios previos habían demostrado cómo la vía de las rho-quinasas parecía jugar un papel importante en la apoptosis de astrocitos debido al consumo de alcohol,<sup>111</sup> por lo que se buscó si la isoforma ROCK1 (que como hemos explicado se encuentra en mayor cantidad en células del sistema inmune), se encontraba implicada. Con su estudio, demostraron no sólo un aumento de los niveles de ROCK1 en los astrocitos expuestos a etanol, sino que en estos casos se producía además este cambio conformacional que conllevaba a la apoptosis. Además, comprobaron que tras usar una variable mutada de ROCK1, la cual no tenía efecto sobre el citoesqueleto de actina de los astrocitos, este proceso de apoptosis se limitaba. Este trabajo se ha corroborado con estudios posteriores, que señalan la importancia de la vía de las rho-quinasas, y más concretamente la isoforma ROCK1, en la respuesta inflamatoria inducida por el etanol en los astrocitos.<sup>112-113</sup>

## **POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LAS RHO-QUINASAS E INFLAMACIÓN ASOCIADA AL CONSUMO DE ALCOHOL**

Los polimorfismos genéticos se definen como una variación del ADN originada en una mutación, la cual se transmite a la descendencia hasta alcanzar una frecuencia superior al 1% en la población general. Se estima que hay una variante en cada 1000 pares de bases de los 3000 millones que configuran el genoma humano. La mayoría de las modificaciones del ADN se producen en unos pocos nucleótidos.<sup>114</sup> Existen diferentes tipos de polimorfismos, siendo los más frecuentes los polimorfismos de un único nucleótido (SNP, *single nucleotide polymorphism*). En este tipo de polimorfismos, la única diferencia entre la variante normal y la mutada consiste en el cambio de un único nucleótido. Entre otros tipos se encuentran los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *restriction fragment length polymorphism*), los cuales indican secuencias específicas de nucleótidos reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción; o los polimorfismos en número de repetición en tándem (VNTR, del inglés *variable number tandem repetition*), repeticiones de secuencias de 9 a 100 pares de bases que se utilizan como marcadores moleculares (sobre todo en pruebas de paternidad y casos de identificación genética en el ámbito judicial). Otros incluyen la delección o inserción de uno o varios de ellos en un punto del genoma.<sup>115</sup>

Los polimorfismos son responsables de buena parte de las diferencias genéticas que establecen la diversidad de la biología humana. Sin embargo, existen variaciones alélicas que no van a tener una repercusión funcional final, al encontrarse localizadas en las regiones silentes del genoma. Se cree que tan sólo un 0,1% de los SNP van a

tener algún tipo de repercusión funcional, dado que sólo aquellos localizados en las regiones codificadoras o en una región promotora del gen, podrían alterar la estructura o función de las proteínas o bien modificar su expresión génica. De esta manera, aunque la variabilidad genética entre dos individuos se estima en unos tres millones de pares de bases (dos personas no emparentadas comparten el 99,9% de los 3000 millones de pares de bases de su genoma), aparentemente, las variantes genéticas que contribuyen realmente a la diversidad humana serían tan sólo de miles.<sup>116-117</sup>

Los polimorfismos genéticos no sólo contribuyen a las diferencias fisiológicas entre diferentes individuos (estatura, color de ojos, color de pelo...) sino que también están implicados en la presencia o ausencia de determinadas enfermedades. Existen enfermedades que se producen con la alteración de un único gen. Son las llamadas enfermedades monogénicas, transmitidas según los patrones de herencia mendelianos y cuyos ejemplos serían la anemia de células falciformes o la fibrosis quística, entre otras.<sup>118</sup> Por otro lado, las enfermedades poligénicas (como la cardiopatía isquémica o la diabetes) se transmiten debido a múltiples genes, cobrando en estos casos una gran importancia las interacciones entre ellos así como los factores ambientales. Es en este tipo de patologías, entre las que se incluyen los trastornos relacionados por el consumo de alcohol como la hepatopatía alcohólica o el trastorno por uso de alcohol, en el que los diferentes polimorfismos genéticos se consideran factores responsables en cierta medida de la susceptibilidad a la aparición de las mismas.<sup>116</sup>

En base a lo anteriormente expuesto, cobra una especial relevancia el estudio de los factores genéticos asociados a la respuesta inflamatoria inducida por el consumo de alcohol. Mientras que los estudios moleculares específicos por sí solos ponen de manifiesto si los polimorfismos son funcionales o silentes, los estudios epidemiológicos son fundamentales para valorar si éstos son relevantes para la salud de la población. Para ello, podemos utilizar diferentes estrategias. Las principales técnicas son los estudios en gemelos, los rastreos hologenómicos (*genome-wide scan*), que nos permiten reconocer regiones cromosómicas asociadas con una determinada enfermedad, y los estudios de asociación de “genes candidatos”. Estos genes son aquellos cuya función puede estar relacionada con la enfermedad de interés y se eligen habitualmente entre los implicados en la patogenia de la enfermedad estudiada.<sup>119-120</sup> En estos estudios de asociación se suelen emplear diseños epidemiológicos del tipo casos y controles o de cohortes.<sup>121-122</sup>

En la dependencia o en el trastorno por uso de alcohol se han realizado varios rastreos hologenómicos así como múltiples estudios de genes candidatos, siendo los genes más consistentemente asociados con esta enfermedad los relacionados con el metabolismo del alcohol.<sup>123-125</sup> En relación con la hepatopatía alcohólica, se ha llevado a cabo hasta la fecha un rastreo hologenómico,<sup>126</sup> además de numerosos estudios de genes candidatos así como meta-análisis de los mismos. Los resultados de estos trabajos han podido confirmar la clara asociación del polimorfismo rs738409 del gen PNPLA3 con la hepatopatía alcohólica y, en menor medida, de genes relacionados con el metabolismo del alcohol o con citoquinas inflamatorias como el TNF-alfa.<sup>127</sup>

### **Polimorfismos genéticos de las rho-quinasas analizados en nuestro trabajo**

Como hemos comentado previamente, las rho-quinasas se han descrito inicialmente como proteínas que forman parte de la organización del citoesqueleto de actina de las células, participando en la contracción celular, apoptosis y proliferación de las mismas. Sin embargo, su estudio posterior ha demostrado su implicación en enfermedades cardiovasculares y autoinmunes, así como su intervención en diferentes procesos fisiológicos ligados a la inflamación.

No se ha analizado hasta el momento la asociación entre diferentes polimorfismos de las rho-quinasas y trastornos inducidos por el consumo de alcohol pero sí existen polimorfismos de las rho-quinasas que han mostrado una asociación con otras enfermedades así como su funcionalidad.

#### **Polimorfismo rs35996865 del gen *ROCK1*.**

Pehlivan et al<sup>128</sup>, demostraron que el SNP del gen *ROCK1* rs35996865, se asocia de manera significativa a la posibilidad de desarrollar esclerosis sistémica. En este caso, la endotelina-1 sería la responsable de activar la vía de las rho-quinasas, llevando a cabo su actividad vasoconstrictora y precursora de la fibrosis a través de este mecanismo.

Otros estudios han intentado probar la relación existente entre diferentes polimorfismos de *ROCK1* y enfermedades inflamatorias y autoinmunes. En modelos experimentales, la activación de la vía de las rho-quinasas reducía de manera sustancial la permeabilidad pulmonar, así como facilitaba el desarrollo de edema y lesión pulmonar. De esta manera, un estudio de casos y controles con alrededor de



200 pacientes, ha conseguido implicar a este polimorfismo de estudio con el desarrollo de distrés respiratorio en neonatos.<sup>129</sup>

Por otro lado, Oguz et al,<sup>130</sup> han conseguido implicar a diferentes polimorfismos de las rho-quinasas en un mayor riesgo de padecer enfermedad de Beçhet, siguiendo el papel de la regulación de estas proteínas en la activación macrofágica, las citoquinas inflamatorias, síntesis del óxido nítrico endotelial, entre otros mecanismos. Si bien en el caso concreto de nuestro polimorfismo estudiado, no encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Por último, diferentes autores han conseguido establecer diferencias estadísticamente significativas por las que pacientes con el polimorfismo indicado poseen un riesgo mayor para el desarrollo de diferentes tipos de cáncer. Esto es debido a la participación de las rho-quinasas en el proceso de la angiogénesis mediante el control de la permeabilidad, proliferación y migración de las células tumorales. Ejemplos son el cáncer renal de células claras, o la asociación con un mayor riesgo de recidiva bioquímica en el cáncer de próstata.<sup>131-132</sup>

### **Polimorfismos rs978906 y rs2230774 del gen *ROCK2*.**

Como se ha mencionado, la isoforma ROCK2 de las rho-quinasas parece expresarse en mayor medida en las células vasculares y miocardiocitos. En nuestro conocimiento, existen todavía pocos estudios que hayan probado una relación existente entre polimorfismos de este gen y enfermedad.

En relación con el polimorfismo rs978906, un trabajo llevado a cabo en más de 800 pacientes seleccionados de una población general sin historia de enfermedad cerebrovascular o cardiopatía isquémica previas, ha demostrado una mayor actividad de ROCK2 en pacientes portadores de este polimorfismo, el cual conllevaba a un aumento de la rigidez arterial carotídea.<sup>133</sup> Esta funcionalidad se explicaría ya que dentro de la actividad reguladora de la actividad de la miosina, la isoforma ROCK2, y en este caso, el polimorfismo estudiado, estaría implicada de manera predominante en la contractibilidad del músculo liso. Esto, junto con su participación en la cascada celular responsable de la activación de las moléculas de adhesión cuando las células endoteliales están expuestas al estímulo inflamatorio explican su implicación en la rigidez arterial.

En el caso del trabajo de Yang et al,<sup>134</sup> la mediación de la ROCK2 en la respuesta inflamatoria, provocaría un daño vascular endotelial y la activación plaquetaria, lo cual explicaría cómo en el análisis de más de 2000 pacientes, la posesión del alelo C de nuestro polimorfismo a estudio asoció un riesgo mayor de ictus isquémico frente a la población control. Otros autores,<sup>135</sup> han conseguido asociar nuestro polimorfismo de estudio a un mayor riesgo de hipertensión esencial asociada a la altitud.

Respecto al polimorfismo rs2230774, como hemos explicado previamente, diferentes estudios demuestran que la vía de las rho-quinasas se encuentra implicada en el estímulo vasoconstrictor del músculo liso de las arterias coronarias. Este efecto parece tener su origen en que éstas producen un aumento de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina y un aumento de la sensibilización al calcio iónico.<sup>136</sup>

En relación al polimorfismo rs2230774, encontramos estudios que lo asocian al síndrome metabólico (la combinación de obesidad, hipertensión, dislipemia y diabetes mellitus tipo 2).<sup>81</sup> Si bien su patogénesis no está aclarada, la resistencia a la insulina juega un papel muy importante en el mismo. La activación de la vía de las rho-quinasas reduce el transporte de glucosa a los músculos mediante la represión de las señales del sustrato 1 del receptor de la insulina (IRS, del inglés, *insulin receptor substrate*).<sup>137</sup> Por otro lado, dada su implicación en la vía inflamatoria, se cree que la activación de las rho-quinasas pueda intervenir en la diferenciación de los adipocitos.<sup>138</sup>

Otros estudios sin embargo, han intentado relacionar nuestro polimorfismo para estudio con un mayor riesgo de padecer ictus isquémico,<sup>139</sup> o con el riesgo de desarrollar glaucoma de ángulo abierto primario sin éxito.<sup>140</sup>

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

1- Determinar la expresión de las rho-quinasas en la respuesta inflamatoria asociado al consumo excesivo de alcohol.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Analizar la expresión de los ARNm de las rho-quinasas (ROCK1 y ROCK2) en sangre periférica de personas que consumen alcohol de forma intensiva respecto a controles.

2- Correlacionar la expresión de las rho-quinasas con la expresión de los TLR y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-8, IL1- $\beta$ ) tras un consumo intensivo de alcohol respecto a controles sanos.

3- Analizar la expresión de rho-quinasas en un modelo celular *in vitro* tras la exposición a etanol, incluyendo:

3.1. Expresión de rho-quinasas en células mononucleadas de sangre periférica expuestas a etanol.

3.2. Expresión de rho-quinasas en astrocitos de ratón expuestos a etanol.

4- Estudiar la asociación entre los siguientes polimorfismos genéticos de las rho-quinasas y la presencia de enfermedad asociada al consumo de alcohol:

- rs35996865 [T>G] del gen *ROCK1*.
- rs2230774 [G>T] del gen *ROCK2*.
- rs978906 [T>C] del gen *ROCK2*.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Análisis de la expresión de rho-quinasas en sangre periférica

#### 2.1.1. Muestra objeto de estudio

Para llevar a cabo los diferentes análisis sobre pacientes con intoxicación etílica aguda, se realizó un diseño transversal de casos y controles, (definiendo unos criterios de inclusión y exclusión, especificados en la tabla 1). La muestra objeto de estudio en esta parte del trabajo se compuso de 62 sujetos: 26 controles sanos y 36 pacientes con diagnóstico de intoxicación etílica aguda secundaria a un episodio de consumo intensivo de alcohol, atendidos en el Servicio de Urgencias del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA).

**Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión para casos y controles.**

Casos	
Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Pacientes que presenten signos o síntomas de intoxicación alcohólica aguda secundaria a un episodio de consumo intensivo de alcohol que acudan al Servicio de Urgencias del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, durante el periodo de reclutamiento (2013-2015).	Enfermedad aguda intercurrente (infecciones, traumatismos, hemorragia...) o alteraciones analíticas no explicadas (anemia, elevación de creatinina o transaminasas, etc.).
Consumo referido de al menos 5 UBE en hombres (50 gramos de etanol) o 4 UBE en mujeres (40 gramos de etanol) durante las 6 horas previas a la valoración en el Servicio de Urgencias.	Consumo de otras drogas de abuso (p. ej. cocaína, cannabis), determinado mediante el análisis toxicológico de orina.
Diagnóstico de sospecha de intoxicación alcohólica aguda confirmado por la presencia de un nivel elevado de etanol en sangre (> 0,8 g/L) y exclusión de la presencia de otros tóxicos por la clínica y/o análisis toxicológico en orina.	Sujetos con dependencia del alcohol (criterios DSM-IV o DSM-5).
	Antecedentes personales referidos o comprobados en el historial clínico de enfermedades crónicas y/o tratamiento que puedan alterar los resultados del estudio (p. ej., infección por virus hepatotropos, enfermedades neoplásicas o autoinmunes, tratamiento con inmunomoduladores).

## Controles

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Voluntarios sanos, con distribución de edad y sexo similares a los casos y un consumo medio de alcohol menor de 1 UBE diaria (10 gramos al día) en el último año.	Los referidos para los casos.  Episodios previos de consumo de alcohol intensivo en el último año.

Tanto para los casos como para los controles se recogieron las siguientes variables mediante entrevista clínica y determinación analítica a partir de la muestra de sangre extraída en el Servicio de Urgencias: edad, sexo, hemograma, perfil hepático, etanol en sangre y tóxicos en orina. Así mismo, se les entregó un cuestionario, de participación también voluntaria, para conocer su patrón de consumo de alcohol y otras drogas, que se adjunta a continuación en la tabla 2.

**Tabla 2. Cuestionario entregado a los participantes en el estudio.**

Cuestiones
1. ¿Has bebido alcohol en los tres últimos días? ¿En qué cantidad?
2. ¿Qué cantidad de alcohol bebes habitualmente?
3. El alcohol que bebes, ¿lo haces diariamente o esporádicamente los fines de semana (botellón)?
4. ¿Cuántas borracheras te coges al mes?
5. ¿Consumes otro tipo de drogas? ¿Cuáles? ¿Con qué frecuencia?

Los pacientes y los controles fueron informados de las condiciones del estudio y firmaron el consentimiento informado (anexo I) para permitir su inclusión.

Tras venopunción periférica se extrajeron muestras para análisis de ADN en tubos con anticoagulante ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), que se detallará posteriormente, y para ARN, como se indica a continuación.

### 2.1.2. Extracción y análisis de ARNm en sangre periférica

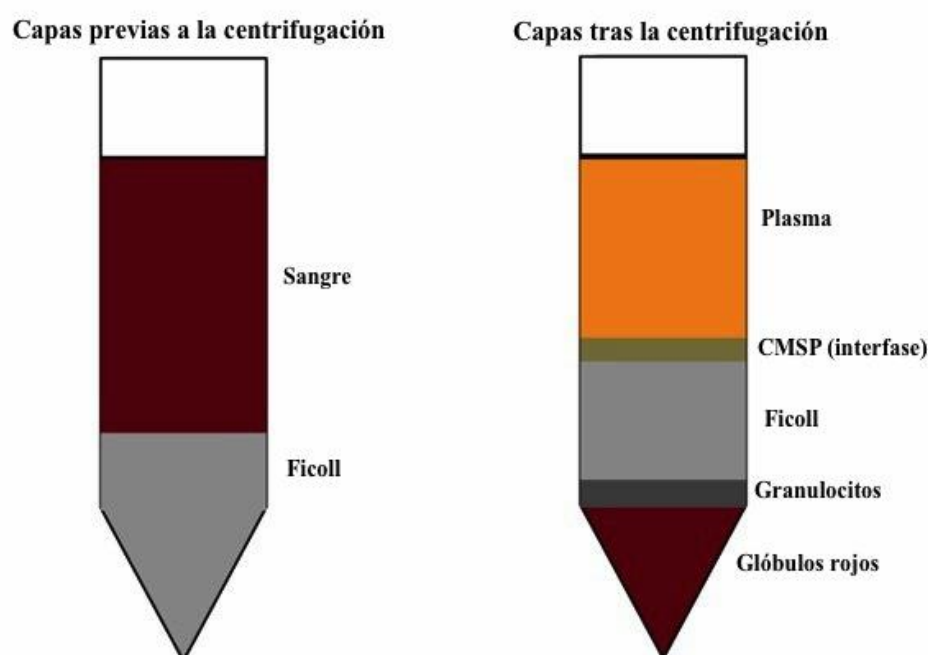
Se extrajeron muestras de sangre (2,5 ml) de cada individuo y se almacenaron en tubos de heparina de litio y tubos de ARN de sangre PAXgene (Qiagen, California, EE. UU.). Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante al menos dos horas y se almacenaron posteriormente a -20 °C. El ARN total se aisló utilizando el kit PAXgene Blood miRNA (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante y se almacenó a -80 °C. La concentración de ARN y la pureza del mismo se examinaron utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. A partir de este punto y una vez obtenido el ARN, el análisis de expresión de ARNm de las rho-quinasas en sangre periférica se describe en el apartado 2.4.

## **2.2. Análisis de la expresión de rho-quinasas *in vitro* en células mononucleadas de sangre periférica**

### 2.2.1. Extracción de muestras y separación de células mononucleadas

Se recogieron muestras de sangre de 9 controles sanos con edades y sexo similares a los sujetos con intoxicación alcohólica mediante venopunción periférica, según protocolo de asepsia habitual, por personal de enfermería del CAUSA. En los sujetos controles reclutados para este objetivo se recogió sangre en dos tubos con EDTA de 10 ml cada uno. A partir de estas dos muestras y con menos de dos horas desde la extracción de las mismas, realizamos la separación de los componentes de la sangre mediante la técnica de Ficoll (Ficoll Histopaque®-1077).

El Ficoll consiste una solución de alto peso molecular de polímeros de sucrosa y diatrizoato de sodio, que al añadir a las muestras de sangre (la cual debe realizarse de manera muy lenta para evitar la mezcla de los diferentes componentes), permite a través de una centrifugación por un gradiente de densidad, separar las células mononucleadas de la sangre periférica (CMSP) del resto de células. Durante este proceso, se forman varias capas, gracias a lo cual podemos extraer las CMSP.



**Figura 9. Separación por gradientes de densidad.** Durante el proceso de centrifugación, se forman varias capas. Por un lado, el sedimento, el cual contiene principalmente granulocitos y eritrocitos cuyo gradiente de densidad es mayor que el del Ficoll. Por encima encontramos la capa del Ficoll y la interfase, en la cual se encuentran las CMSP. Finalmente, sobre la interfase, se encuentran las plaquetas y el plasma. Modificado de Lin Z, et al.<sup>141</sup>

Este procedimiento se realiza siempre en una cabina de seguridad biológica (en nuestro caso, cabina de seguridad biológica Class II, 0,4 m/s | BioUltra®, de la marca Telstar®), mezclando la sangre de las muestras con 15 ml de Ficoll Histopaque®-1077 en tubos de centrífuga Falcon® de 50 ml. Tras esto, se centrifugan en centrífuga Eppendorf modelo 5810 a 1600 revoluciones por minuto (rpm) durante 36 minutos



sin freno. De esta manera, se consigue la interfase en la que se encuentran las CMSP, la cual se recoge y deposita en unos nuevos tubos Falcon®. Después, se añaden 30 ml de tampón fosfato salino o buffer fosfato salino a temperatura ambiente (PBS, del inglés, *phosphate buffered saline*) a la interfase extraída. Se desecha el sobrenadante con pipeta y se centrifuga de nuevo a 1200 rpm durante 10 minutos a 4 °C.

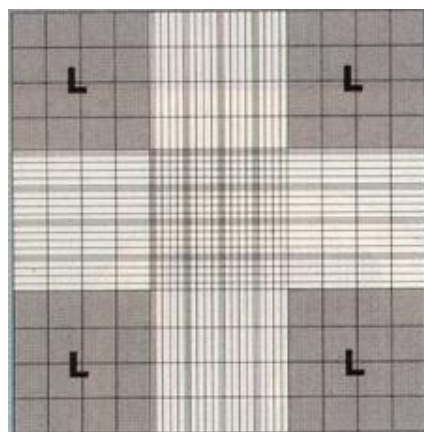
El resultado de esta centrifugación, el pellet, se resuspende y se mezcla con 1 ml de medio de cultivo DMEM (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle's medium*; Sigma-Aldrich Chemical Co.™), calentado previamente al baño maría a 37 °C (para evitar la muerte celular por choque térmico). El DMEM utilizado en nuestro estudio es el DMEM 41966 de la marca Thermo Fischer Scientific™ al que se le añade un preparado de suero bovino fetal o FBS (del inglés, *fetal bovine serum*) 10% así como 0,5 ml de penicilina y 0,5 ml de estreptomicina. Ambos componentes se homogenizan y, previo a su cultivo en placas Thermo Scientific™ Nunc™, se realiza el conteo celular en la cámara de recuento Neubauer.



**Figura 10. Cámara de recuento Neubauer® Marienfeld-Superior™ 2017.** “Tomado de la página web de Paul Marienfeld GmbH & Co.KG”

Para realizar el recuento celular, debe colocarse el cubreobjetos sobre el portaobjetos de la cámara e introducir entre ambos la muestra celular preparada. Se toman 100 µl de la muestra para realizar el conteo celular en la cámara. La velocidad de llenado de la misma debe ser homogénea, evitando así una mala distribución de las células, que

traerá errores en el recuento (la cámara no debe quedarse seca ni inundarse). Se coloca la cámara en el microscopio óptico (Nikon Eclipse TS100®) y se procede al recuento, eligiendo para ello las cuadrículas apropiadas (L en la figura 11).



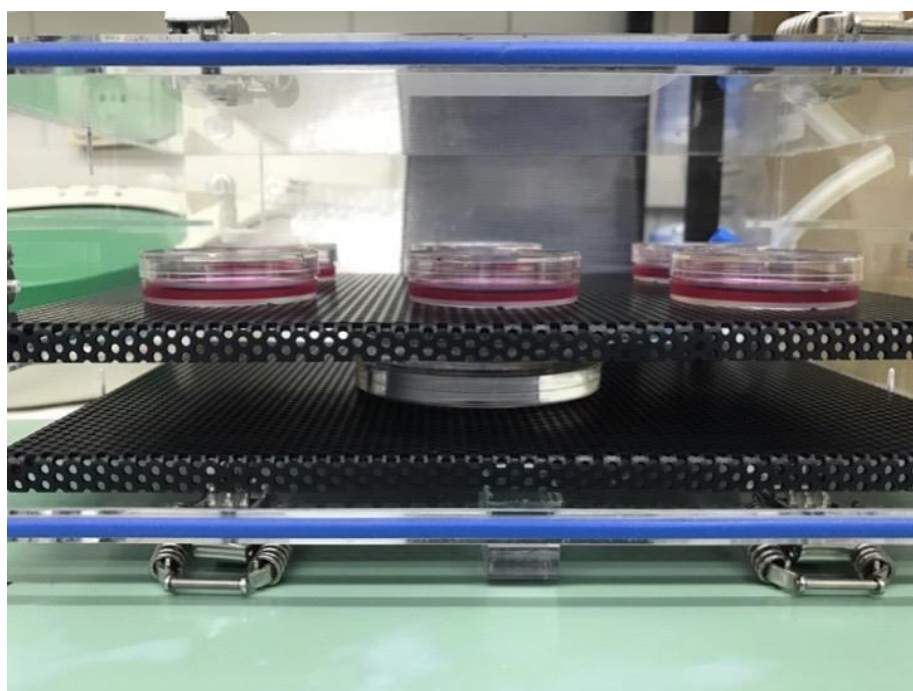
**Figura 11. Retículas de una cámara de Neubauer.**

Se cuantifican un total de N células entre las cuatro áreas de tal manera que se obtiene una concentración en la suspensión en células/ml. Esta concentración se tiene que multiplicar por los ml de solución que ha sido preparada con medio de cultivo y muestra. Tras el contaje, se procede a su cultivo en placas que se almacenan en una incubadora de CO<sub>2</sub> Heracell™ 150i durante 24 horas.

#### 2.2.2. Incubación de células con etanol y obtención de ARNm

Las células mononucleadas de sangre periférica obtenidas de los sujetos controles se estimularon con las siguientes cuatro condiciones en nuestro experimento: control, etanol (50 mM, 6 horas), lipopolisacárido (100 ng/μl durante 6 horas) y etanol 50 mM más lipopolisacárido 100 ng/μl (6 horas en total, habiendo añadido el lipopolisacárido en la última hora). Para ello, primero se retira el medio de cultivo, lavando las muestras en las placas con PBS atemperado, centrifugando posteriormente los sobrenadantes para resuspender el sedimento o pellet para cada condición.

Se incuban las muestras deseadas (etanol y etanol más lipopolisacárido) con 5  $\mu$ l de etanol puro (consiguiendo así una concentración de 50 mM de etanol por condición). Posteriormente, se introducen las muestras que queremos terminar de intoxicar con alcohol en una cámara incubadora de Billups-Rothenberg en la que colocamos además una placa en la que previamente hemos diluido 50 ml de agua destilada con 0,25 ml de etanol absoluto para saturarla de alcohol (obteniendo una saturación del ambiente de etanol diluido entre 100-200 mM).



**Figura 12. Cámara incubadora de Billups-Rothenberg.** En ella se aprecian los cultivos celulares con las condiciones de etanol y etanol más lipopolisacárido. En la bandeja inferior, colocamos la placa con la dilución de etanol. Fotografía propia tomada en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca.

Se llena la cámara incubadora de Billups-Rothenberg con CO<sub>2</sub> y se introduce junto con el resto de condiciones (control y LPS) en la incubadora de CO<sub>2</sub> Heracell™ 150i. En función de nuestro experimento, se aloja la cámara en la estufa el tiempo necesario (4, 6 o 24 horas en función de las condiciones experimentales), retirándola para la adicción del lipopolisacárido una hora antes de completar el experimento.

Tras completar las horas de incubación indicadas, se sacaron las placas de la incubadora de CO<sub>2</sub> y de la cámara de Billups-Rothenberg, para colocarlas en cajas isotérmicas de poliestireno con hielo. De nuevo en la cabina de seguridad biológica, se extrae el medio de cultivo de las placas y se centrifuga posteriormente a 1200 rpm durante 10 minutos, desechando el sobrenadante y conservando el sedimento. Asimismo, se limpian las placas con PBS frío a la vez que con un raspador de células se levantan las células que se hayan podido quedar adheridas, recogiendo el PBS y añadiéndolo a los tubos Falcon® con el sedimento previamente obtenido con la centrifugación. Las placas vacías se examinan de nuevo en el microscopio óptico para comprobar que efectivamente no han quedado células adheridas.

Una vez realizada esta comprobación, se añaden 200 µl de TRIzol™ Reagent en los tubos Falcon® que contienen los cultivos con las diferentes condiciones (el cual contiene tiocinato de guanidina y ácido fenólico), con el objetivo de desnaturalizar las proteínas para el posterior análisis del ácido ribonucleico (ARN). Tras la adición del TRIzol™ Reagent, se homogeniza y se congela a -80 °C.

Al día siguiente, se retiran las muestras del congelador y se dejan descongelar a temperatura ambiente. Se mezcla con el agitador tipo vórtex durante unos segundos para a continuación, comenzar el proceso de extracción de ARN. Para ello, se añaden 200 µl de cloroformo a cada condición, se mezcla de nuevo gracias al agitador tipo vórtex y se dejan incubar 3 minutos a temperatura ambiente.

Se centrifuga a 1200 rpm y a 4 °C durante 15 minutos, recuperando el sobrenadante e incorporándolo a tubos de microcentrífuga Eppendorf PhysioCare Concept®. Después se añaden 0,5 ml de isopropanol a cada condición y se deja incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga a 12200 g (fuerza centrífuga relativa, fcr o rcf, del inglés, *relative centrifugal force*) durante 10 minutos a 4 °C en la centrifugadora de Eppendorf (modelo 5417R). Se retira el sobrenadante, se añade a cada condición 0,1 ml de etanol al 70% y se centrifuga de nuevo a 7000 g rcf durante 5 minutos a la misma temperatura. Se desecha de nuevo el sobrenadante y dejamos secar a temperatura ambiente durante una hora.

Posteriormente, se añaden 50 µl de dietilpirocarbonato (DEPC), para reducir el riesgo de degradación del ARN por RNasas que catalicen la hidrólisis de ARN en componentes más pequeños. Todos estos pasos se realizan con los tubos de microcentrífuga en hielo, para evitar en la medida de lo posible la desintegración del ARN. Finalmente, se utiliza un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 para cuantificar y evaluar la pureza del ARN extraído para su posterior cuantificación. A partir de aquí, igual que ocurre con las muestras de ARN obtenidas directamente de sangre periférica, se realiza el análisis de la expresión de rho-quinasas como se describe en el apartado 2.4.

## **2.3. Análisis de la expresión de las rho-quinasas en astrocitos murinos *in vitro***

### **2.3.1. Obtención de las muestras**

Las diferentes muestras de astrocitos se obtuvieron de ratas albinas de la raza Wistar, criadas y proporcionadas por el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca. Los animales fueron criados en jaulas, manteniéndose un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y con la fase de oscuridad establecida entre las 20:00 horas y las 8:00 horas del día siguiente. Las condiciones ambientales del animalario fueron las siguientes: humedad relativa entre el 45% y el 65% y temperatura entre 20 °C y 25 °C. Los animales se alimentaron *ad libitum* con una dieta sólida estándar (17% de proteínas, 3% de lípidos, 58,7% de componente glucídico, 4,3% de celulosa, 5% de minerales y 12% de humedad), teniendo acceso libre al agua de manera constante.

La etapa gestacional se controló limitando la cohabitación de las ratas vírgenes con machos a una única noche. A las 9:00 horas del día siguiente, se aislaron las ratas que tuvieron presencia de espermatozoides en el frotis vaginal acompañados de células epiteliales de la vagina, las cuales son características de un día fértil del estro (que se define como el periodo propicio para la actividad sexual en la hembra). Bajo estas condiciones, el periodo gestacional de la rata se asumió de 21,7 días. Todas las manipulaciones y los procedimientos con animales están de acuerdo con la normativa vigente de la Comisión Europea 18.06.2007 (2007/526/CE) y de la Legislación Española (RD 1201/2005) en relación a la acomodación y al cuidado de animales de experimentación. Los experimentos realizados en este apartado y el siguiente se realizaron en el laboratorio de la Dra. Ángeles Almeida (Instituto de Biología

Funcional y Genómica) bajo protocolos aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

### 2.3.2. Cultivo de astrocitos

Los cultivos primarios de astrocitos corticales se obtuvieron de neonatos de ratas de 0 a 24 horas de edad, según se ha descrito previamente.<sup>142</sup> Los animales se limpiaron con etanol al 70%, se decapitaron y el cerebro entero se trasladó a una cabina de flujo laminar. El cerebelo y el bulbo olfatorio se eliminaron usando pinzas y los hemisferios cerebrales se limpiaron quitándoles las meninges y los vasos sanguíneos pasándolos por filtro de papel Whatman™. El tejido se colocó en una placa de poliestireno con la solución de disgregación EBSS® [(del inglés *Earle's Balanced Salt Solution*) compuesta por: NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,01 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, glucosa 4 mM, rojo fenol 10 mg/ml, albúmina 0,3% [p/v] y DNAsa tipo I 20 µg/ml, pH 7,2.

Tras esto, el tejido parcialmente disgregado se depositó en un tubo Falcon® de 50 ml y se decantó durante 4 minutos. El pellet se resuspendió en una solución de tripsinización (solución de disgregación EBSS® suplementada con tripsina 0,025%). La digestión enzimática del tejido se realizó a 37 °C durante 15 minutos en un baño termostático, agitando suavemente cada 3 o 4 minutos para facilitar el proceso.

La tripsinización se detuvo añadiendo FBS a una concentración final del 10% y el tejido se centrifugó a 500 g durante 5 minutos (centrifugadora Eppendorf modelo 5702R). El pellet resultante se resuspendió en 12 ml de la solución de disgregación, haciéndolo pasar 9 veces a través de una pipeta Pasteur, previamente siliconada, para favorecer el proceso y evitar la rotura celular.

El sobrenadante, el cual contiene las células disociadas, se recogió en un tubo Falcon® de 50 ml. Este proceso se repitió para incrementar el rendimiento, combinándose finalmente los sobrenadantes, los cuales se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió primero en 1 ml de DMEM, cuidadosamente seguido por otros 19 ml de DMEM. De esta suspensión, se recogió una pequeña parte o alícuota de 10 µl, añadiéndose 40 µL de Trypan-Blue (Sigma-Aldrich™) al 0,4% y 30 µl de DMEM para el recuento celular en una cámara Neubauer y bajo un microscopio de contraste de fases (modelo CK30, Olympus™).

La suspensión celular se sembró en DMEM suplementado con FBS al 10% v/v en frascos de cultivo de 175 cm<sup>2</sup> (BD Falcon™), a razón de 3-4 cerebros por frasco. Las células se mantuvieron en un incubador a 37 °C, con una atmósfera saturada de vapor de agua, compuesta por un 95% de aire y un 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo fue sustituido dos veces por semana. A la semana de cultivo, se agitaron a 200 rpm en un agitador orbital dentro del incubador termostatzado, para eliminar la microglía y se sembraron en placas de poliestireno de diferentes tamaños según el experimento. Después de 2 semanas (15 días in vitro [DIV]), el cultivo tuvo una pureza aproximada del 92-95% determinada por inmunorreacción con el anticuerpo frente a Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Sigma-Aldrich™, el cual es un anticuerpo que se utiliza para ver la pureza a través del *western*.

Todos los medios de cultivo se suplementaron con penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y anfotericina B (0,25 µg/ml, de Sigma-Aldrich™).



### 2.3.3. Resembrado de astrocitos y cultivo con etanol

Tras los experimentos anteriores y obtener la suspensión celular de astrocitos, se prepararon las muestras en las diferentes condiciones experimentales: control, etanol 50 mM durante 24 horas, LPS 100 ng/μl durante 24 horas, etanol 50 mM y LPS 100 ng/μl (durante 24 horas y 1 hora, respectivamente). Todas las condiciones se midieron a las 24 horas de comenzar el experimento.

A partir de un frasco de astrocitos con un 100% de confluencia tras incubación en la estufa de CO<sub>2</sub>, se procedió a atemperar el PBS, el medio (DMEM suplementado con FBS al 10%) y la tripsina, todo ello dentro de la cabina de seguridad. A continuación se retira el sobrenadante del frasco mediante aspirado y se añaden 10 ml de PBS para lavar la muestra, dejándolo 1 minuto aproximadamente. Se retira el PBS para añadir 6 ml de tripsina y dejamos durante 3 minutos en el incubador. Tras esto, se golpea ligeramente el matraz con los astrocitos para asegurar que los astrocitos se despeguen bien antes de recoger el sobrenadante. Se recoge el sobrenadante y se pasa a un Falcon® de 50 ml, en el que previamente se habrán agregado 600 μl de PBS para frenar la tripsinización. Se centrifuga la muestra durante 5 minutos a 500 g y se retira el sobrenadante.

Tras esto, se resuspende en 1 o más mililitros de DMEN (dependiendo de las placas que vayamos a usar en el experimento) y se traslada la muestra a las diferentes placas para cada condición, añadiendo medio de cultivo hasta poner 10 ml por placa. Se dejan las placas en estufa cambiando el medio cada 3-4 días, hasta ver que la confluencia sea del 100% y se pueda hacer el experimento.



**Figura 13. Astroцитos vistos al microscopio óptico, con un 100% de confluencia**

Para las placas con la condición de etanol, se añaden 5  $\mu\text{l}$  de etanol para alcanzar 50 mM de concentración por placa. Posteriormente, se introducen las diferentes placas con etanol en la cámara incubadora de Billups-Rothenberg en la que se ha colocado una placa con una concentración elevada de etanol (100-200 mM), al igual que se hacía con las muestras obtenidas de sangre periférica. Se administra también  $\text{CO}_2$  a la cámara y se introduce junto con el resto de condiciones en la incubadora para retirarlas 24 horas después (a las 23 horas, en la condición correspondiente, se le añade una concentración de LPS de 100 ng/ $\mu\text{l}$ ).

Una vez retiradas las placas del incubador, se recoge el sobrenadante y se lava con PBS atemperado. Se añaden 500  $\mu\text{l}$  de trizol, se retiran con un raspador de células, se recogen y congelan a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción de ARN para la posterior síntesis de ADNc según se describe en el siguiente apartado.

## 2.4. Síntesis de ADNc a partir de ARN y determinación de la expresión de las rho-quinasa

### 2.4.1. Síntesis de ADNc a partir de ARN

La síntesis de ADNc a partir de ARN obtenido de sangre periférica total, de células mononucleadas de controles sanos y de cultivos de astrocitos (tal y como se detalla en los apartados 2.1., 2.2. y 2.3, respectivamente) se realizó mediante transcripción inversa. Para ello utilizamos el preparado comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*® (Thermo Fischer Scientific®). A los 10 µl de la muestra de ARN diluida con H<sub>2</sub>O (trabajando con una concentración de 0,5 ng/ml), previamente extraído, se le añaden un total de 10 µl del preparado (siempre realizado en hielo) según la siguiente composición:

**Tabla 3. Reactivos empleados para la realización de la transcripción inversa.**

10X RT Buffer	2,0 µl	En función del número de muestras, se multiplica por ese número las concentraciones anteriores  (Ejemplo para 4 muestras)	8 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl		3,2 µl
10X RT Random Primers	2,0 µl		8 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0 µl		4 µl
RNase Inhibitor	1,0 µl		4 µl
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	3,2 µl		12,8 µl
<b>Volumen total de la reacción</b>	10,0 µl		40 µl

El volumen final de la amplificación fue de 20 µl por cada muestra.

Como control negativo de la reacción, se mezclaron todos los componentes en una muestra sin ADNc (*non-template control*), con el fin de detectar la presencia de una posible contaminación en la mezcla de la reacción.

Tras esto, se centrifuga en microcentrífuga MiniStar silverline™ (VWR Collection®), y se comienza la síntesis de ADNc en el termociclador GeneAmp PCR System 9700 Discontinuation® (ThermoFischer Scientific™) según las siguientes condiciones: 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 120 minutos, 85 °C durante 5 minutos y 4 °C durante otros 5 minutos.

#### 2.4.2. Cuantificación de la expresión génica mediante PCR

Como hemos explicado previamente, para determinar si la expresión de las rho-quinasas se encuentra alterada en los pacientes con consumo intensivo de alcohol, se analiza la expresión relativa del ARN mensajero (ARNm) de las dos isoformas de la proteína ROCK (ROCK1 y ROCK2) en la sangre periférica extraída de nuestros pacientes. Para ello, se utilizó la técnica de la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), empleando el aparato de PCR StepOnePlus® (Applied Biosystems™).

Se utilizaron cebadores específicos de las rho-quinasas (Tabla 4), en concreto los cebadores *ROCK1* (NM\_005406) y *ROCK2* (NM\_004850) como genes de estudio y de la  $\beta$ -actina (NM\_001101) como gen de referencia (Integrated DNA Technologies®). Se eligió el gen de la  $\beta$ -actina como gen de control para realizar el análisis de expresión de ARNm debido a su estabilidad de expresión en la muestra del estudio. Por otro lado, se empleó el *master mix* FastStart Universal SYBR® Green Master (Roche™), que incorpora SYBR Green I como fluoróforo de referencia. Cada amplificación se realizó por duplicado para reducir la variabilidad de concentración en las muestras. Como hemos explicado previamente, como control negativo de la reacción, se añadieron todos los componentes en un tubo sin ADNc (*non-template control*).

**Tabla 4. Condiciones de la qPCR de las dos isoformas de la proteína ROCK (ROCK1 y ROCK2)**

<b>Cebadores ROCK1</b>	<b>Sentido</b> 5'-ACCTGTAACCCAAGGAGATGTG-3'  <b>Antisentido</b> 5'-CACAATTGGCAGGAAAGTGG-3'	
<b>Cebadores ROCK2</b>	<b>Sentido</b> 5'-AAGTGGGTTAGTCGGTTG-3'  <b>Antisentido</b> 5'-GGCAGTTAGCTAGGTTTG-3'	
<b>Programa</b>	<b>1 ciclo</b>	95 °C durante 10 minutos
	<b>40 ciclos</b>	95 °C y 60 °C durante 15 y 30 minutos respectivamente
	<b>1 ciclo</b>	95 °C y 60 °C durante 15 y 60 minutos respectivamente
<b>Tamaño estimado del amplicon</b>	97 pb	

pb: pares de bases

El perfil térmico utilizado en la qPCR se detalla a continuación:

- **Fase pre-PCR:** 1 ciclo a 95 °C durante 10 minutos.
- **Fase de amplificación:** 40 ciclos a 95 °C y 60 °C durante 15 y 30 minutos respectivamente.
- **Fase de disociación:** 1 ciclo a 95 °C y 60 °C durante 15 y 60 minutos respectivamente.

### Análisis cuantitativo de la expresión génica

La cuantificación de la expresión relativa del ARNm de las isoformas *ROCK1* y *ROCK2* se ha calculado usando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , tras ser normalizada respecto a la expresión del gen de la  $\beta$ -actina (ACTB). La decisión de utilizar este gen como referencia, se basa en estudios previos en los que la estabilidad de su expresión ha sido validada.<sup>143-144</sup>

**Tabla 5. Condiciones de la qPCR para el análisis de expresión del ARNm de la ACTB**

<b>Cebadores</b>	<b>Sentido</b> 5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3'  <b>Antisentido</b> 5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'	
<b>Programa</b>	<b>1 ciclo</b>	95 °C durante 10 minutos
	<b>40 ciclos</b>	95 °C y 60 °C durante 15 y 30 minutos respectivamente
	<b>1 ciclo</b>	95 °C y 60 °C durante 15 y 60 minutos respectivamente
<b>Tamaño estimado del amplicon</b>	97 pb	

pb: pares de bases

## **Análisis de la curva de fusión**

Para verificar que los productos de PCR amplificados correspondían a la secuencia de interés, se llevó a cabo el análisis de la morfología de las curvas de fusión o curvas de disociación, para lo cual se programó un ciclo de desnaturalización (de 60 °C a 95 °C) al final de cada reacción de PCR.<sup>145-146</sup>

## **2.5. Análisis de los polimorfismos genéticos en pacientes con consumo excesivo de alcohol y/o hepatopatía alcohólica**

### **2.5.1. Muestra objeto de estudio**

En este análisis se incluyeron un total de 645 individuos, todos ellos varones, de los que 421 eran pacientes alcohólicos y 224 controles sanos. Los 421 pacientes presentaban consumo excesivo de alcohol con un diagnóstico de hepatopatía alcohólica (hepatitis alcohólica o cirrosis hepática enólica) o, en el caso de ausencia de lesión hepática, consumidores crónicos de más de 100 g de etanol al día durante al menos diez años. La media de edad de los pacientes alcohólicos fue de 52,2 años (desviación estándar [DE] = 12,1). En esta muestra se excluyeron los consumidores de otro tipo de sustancias de abuso (a excepción de la nicotina), así como aquellos que presentaban diagnósticos de enfermedades psiquiátricas mayores.

La mayoría de los pacientes fueron reclutados en la Unidad de Alcoholismo y planta de hospitalización de los Servicios de Medicina Interna y Digestivo del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Una parte más reducida correspondió a pacientes derivados del Hospital Virgen de la Concha (Zamora), así como pacientes con hepatitis alcohólica derivados del Hospital Universitario de Amiens (Francia).

Para el diagnóstico de los trastornos relacionados con el consumo de alcohol, se utilizaron en 306 pacientes los criterios diagnósticos DSM-IV, aplicados de forma sistemática mediante una entrevista semi-estructurada. Del total de los 421 pacientes alcohólicos, 187 cumplían criterios de dependencia del alcohol y 119, de abuso del alcohol,. Entre los pacientes alcohólicos, 217 de ellos presentaban enfermedad hepática alcohólica definida como presencia de cirrosis o hepatitis alcohólica (demostrada esta última por criterios clínicos, analíticos y, cuando fue necesario, histopatológicos). En el caso de la cirrosis hepática, encontramos 102 pacientes, habiéndose establecido el diagnóstico en 93 de ellos mediante biopsia hepática y hallazgos anatomopatológicos compatibles. En los casos restantes, la cirrosis hepática se definió por criterios clínicos (estigmas de hepatopatía crónica, historia de ascitis, encefalopatía hepática o sangrado digestivo por varices esofágicas) y hallazgos sugerentes de cirrosis en la ecografía hepática o de varices gastroesofágicas en la endoscopia digestiva alta. En estos casos, la biopsia hepática estaba contraindicada por la presencia de alteraciones de la coagulación.

Los restantes 204 pacientes fueron clasificados como libres de EHA dado que no presentaban estigmas de hepatopatía crónica (alteraciones cutáneas, hepatoesplenomegalia, ginecomastia, pérdida de vello o atrofia testicular), las pruebas analíticas no se encontraban alteradas (excepto elevaciones aisladas de la gamma-glutamyl-transferasa o GGT), y por la ausencia en las pruebas de imagen de hallazgos sugestivos de enfermedad hepática. Se excluyeron los pacientes alcohólicos que no cumplían estos criterios y en los que no estuviera indicada la realización de biopsia hepática, dada la imposibilidad de clasificarlos en un grupo concreto de estudio. Se descartaron además mediante pruebas diagnósticas habituales, otras causas de hepatopatía diferentes a las del alcoholismo en los pacientes con cirrosis. Las



serologías de los virus de la hepatitis B y C, fueron negativas en los pacientes de ambos grupos.

La media de edad de los individuos controles fue de 47,9 años (DE=16,5), con un consumo habitual de menos de 10 gramos de alcohol/día. Ninguno de ellos tenía historia personal o familiar de alcoholismo o de consumo de drogas, salvo tabaquismo. Todos los pacientes y los controles procedentes de Castilla y León eran de origen caucásico, originarios de la Comunidad Autónoma de Castilla y León así como sus ascendientes hasta el segundo grado. Las muestras fueron obtenidas previo consentimiento, siguiendo las ordenaciones legales para Estudios Clínicos en España y previa aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Área de Salud de Salamanca.

#### 2.5.2. Extracción de ADN genómico

La sangre de los pacientes y controles se recogió previo consentimiento informado en tubos con EDTA tras punción venosa periférica en las condiciones habituales de asepsia. Para la extracción de ADN genómico a partir de las células de sangre periférica, se siguieron los siguientes procesos:

##### *a) Obtención de células mononucleadas.*

Para aislar las células se utilizó la centrifugación repetida y la lisis eritrocitaria con solución hipotónica (centrifugando la sangre total en 50 ml de agua bidestilada [ddH<sub>2</sub>O] durante 15 minutos, a 1500 rpm y a 4 °C). Se recuperó la interfase creada y se lavaron las células en tampón Fornace (0,25 M Sacarosa; 50 mM Tris-HCl pH: 7,5; 25 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Se centrifugó de nuevo a 1500 rpm durante 10 minutos,

desechando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en tampón Fornace a una concentración estimada de  $5 \times 10^6$  células/ml. Tras ello, se añadió EDTA con el objetivo de inactivar las nucleasas (con una concentración final de 10 mM), proteinasa K, para conseguir la degradación de las proteínas, (Boehringer Mannheim FRG<sup>TM</sup>) y dodecil sulfato sódico o SDS, (1% de concentración final), para la lisis de las membranas celulares, incubándose esta mezcla a 55 °C durante 8-16 horas.

#### *b) Purificación del ADN*

Tras la incubación, se procede a la extracción y purificación del ADN mediante el uso de fenol-CIAA (cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 v/v). Para ello, se centrifuga durante 10 minutos a 2000 rpm a temperatura ambiente. Se recoge el sobrenadante (el cual contiene el ADN en solución) y se añade, con un volumen similar, siendo sometido a una segunda centrifugación en las mismas condiciones para separar la fase que contiene el ADN y la fase con posible detritos celulares. Se recupera de nuevo el sobrenadante con el ADN y se causa su precipitación usando para ello 2,5 ml de etanol puro a la temperatura de -20 °C, para posteriormente lavarlo con etanol al 70% y resuspenderlo en ddH<sub>2</sub>O.

#### *c) Cuantificación del ADN*

La concentración así como el grado de contaminación proteica del ADN obtenido se calcularon tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm, respectivamente, en un espectrofotómetro (GeneQuant®, Pharmacia<sup>TM</sup>) mediante la fórmula detallada a continuación:

$$\mu\text{g de ADN/ml} = \text{DO } 260 \times \text{factor de dilución} \times 50$$

El cociente DO260 / DO280 se utilizó para determinar el grado de contaminación proteica, ya que 260 nm es la longitud de onda a la que se absorbe el ADN y 280 nm la longitud a la que se absorben las proteínas. Consideramos aceptables aquellos valores comprendidos entre 1,6 y 2,0, siendo el óptimo 1,8. Valores inferiores a 1,6 fueron interpretados como contaminación de la muestra por proteínas o por solventes orgánicos, por lo que en dichos casos se repitió el experimento realizando una nueva purificación del ADN. Valores superiores a 1,8 se interpretaron como un exceso de ARN, el cual se eliminó tratando la solución de ADN con ARNasa y purificando de nuevo la muestra según el método descrito anteriormente.

Las muestras de ADN, con una concentración entre 1000 y 1500 µg/ml, fueron conservadas a una temperatura de -20 °C en tubos Eppendorf, con el fin de evitar su degradación progresiva del ADN y la posible contaminación por microorganismos.

### 2.5.3. Análisis de polimorfismos genéticos en el ADN obtenido

La discriminación alélica de los polimorfismos analizados se llevó a cabo mediante la amplificación de las secuencias de ADN que contienen dichas regiones, utilizando para ello la técnica de la PCR a tiempo real. Se ha nombrado cada polimorfismo de acuerdo a su número de identificación (rs#) según consta en la base de datos del *National Center for Biotechnology* (NCBI), disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>.

Con la técnica de PCR a tiempo real, podemos detectar y evaluar la progresión de la reacción de amplificación en cada uno de sus ciclos. Esta técnica se fundamenta en la adaptación de un termociclador a un lector de fluorescencia el cual detecta la fluorescencia emitida por sondas o componentes intercalantes unidos al ADN. El

incremento de ADN en cada ciclo de amplificación se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales.

Para llevar a cabo la discriminación alélica de los polimorfismos se empleó el sistema StepOnePlus® con sondas TaqMan MGB® (Applied Biosystems™). Estas sondas son oligonucleótidos marcados que hibridan específicamente y constan de:

- Un donador (fluorocromo) en el extremo 5', que absorbe energía y pasa a un estado excitación, de tal manera que al volver al estado inicial, emite el exceso de energía en forma de fluorescencia.

- Un aceptor (*quencher*) en el extremo 3' que capta la energía de la fluorescencia liberada por el donador y la disipa en forma de calor. Para que la fluorescencia no sea emitida permanentemente, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas, de tal manera que la parte aceptora pueda captar dicha energía en su totalidad.

En los ensayos de discriminación alélica realizados para este estudio, los fluorocromos utilizados para el reconocimiento de cada alelo han sido VIC y FAM (con un espectro de excitación máximo  $\lambda_{\text{abs}}$  de 528 nm y 492 nm y un espectro de emisión máximo  $\lambda_{\text{em}}$  de 546 nm y 515 nm, respectivamente).

Durante la PCR a tiempo real, y mientras la sonda conserve su integridad, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor debido a su proximidad espacial. Sin embargo, durante la amplificación, la enzima ADN-polimerasa, cuando se desplaza a lo largo de la cadena en su acción sintética, y debido a su actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose

la liberación del fluorocromo donador. Esto provoca una separación física entre el donador y aceptor, por lo que la energía liberada no es captada por el aceptor, y la fluorescencia emitida por el donador es captada por el lector (Figura 12).<sup>147-148</sup>

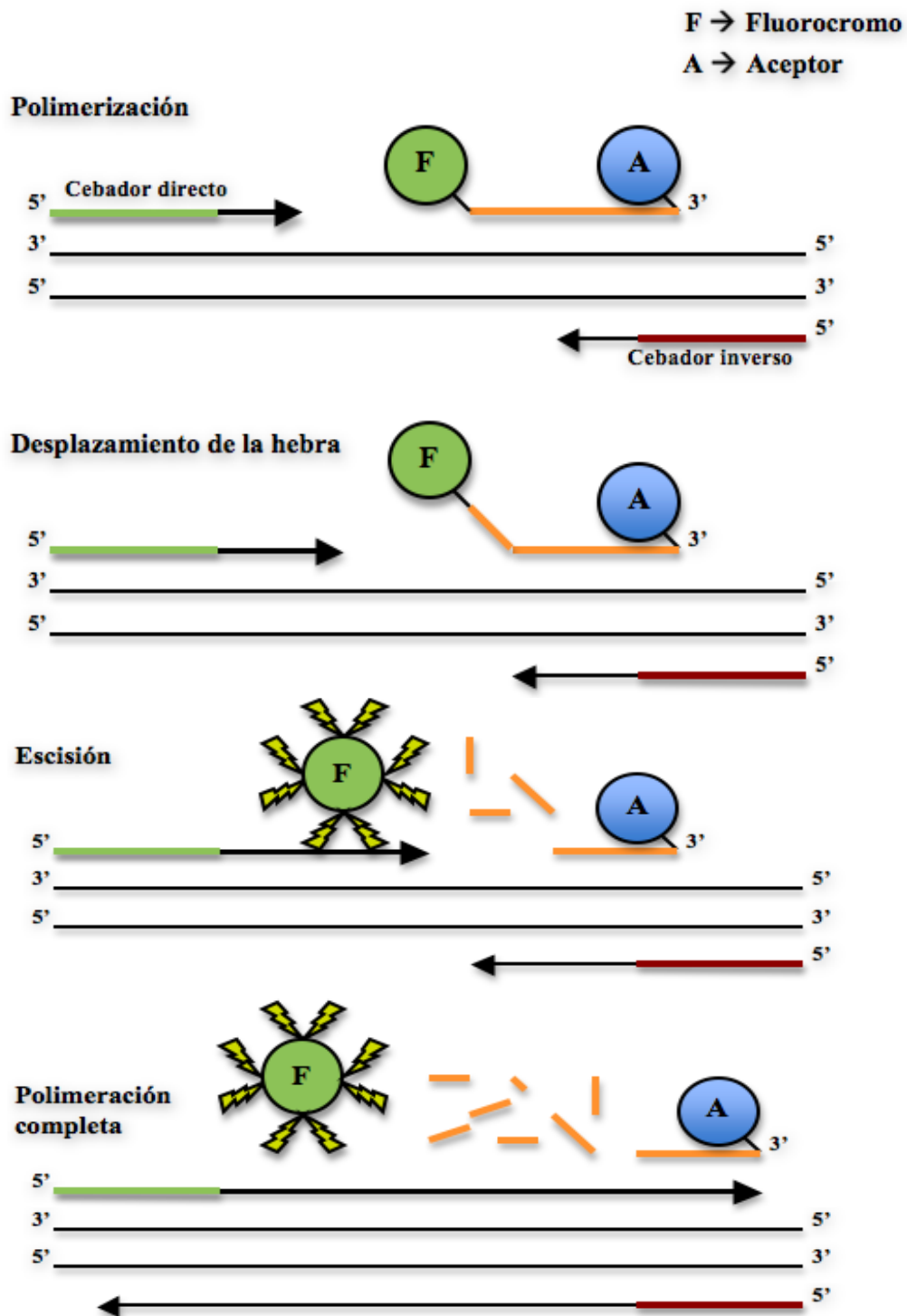


Figura 14. Mecanismo de acción de las sondas TaqMan® en la PCR.

## 2.6. Condiciones de la PCR para los polimorfismos genéticos analizados

Las condiciones utilizadas para el análisis de los diferentes polimorfismos (rs35996865 [T>G] del gen *ROCK1*, rs2230774 [G>T] del gen *ROCK2* y rs978906 [T>C] del gen *ROCK2*) fueron las mismas, a excepción de las sondas utilizadas. Para un volumen total de 10 µl se utilizaron:

- TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG: 5 µl.
- Sonda: 0,25 µl.
- ddH<sub>2</sub>O: 4,25 µl.
- ADN: 2 µl.

Para la realización de la PCR a tiempo real se utilizaron las siguientes condiciones:

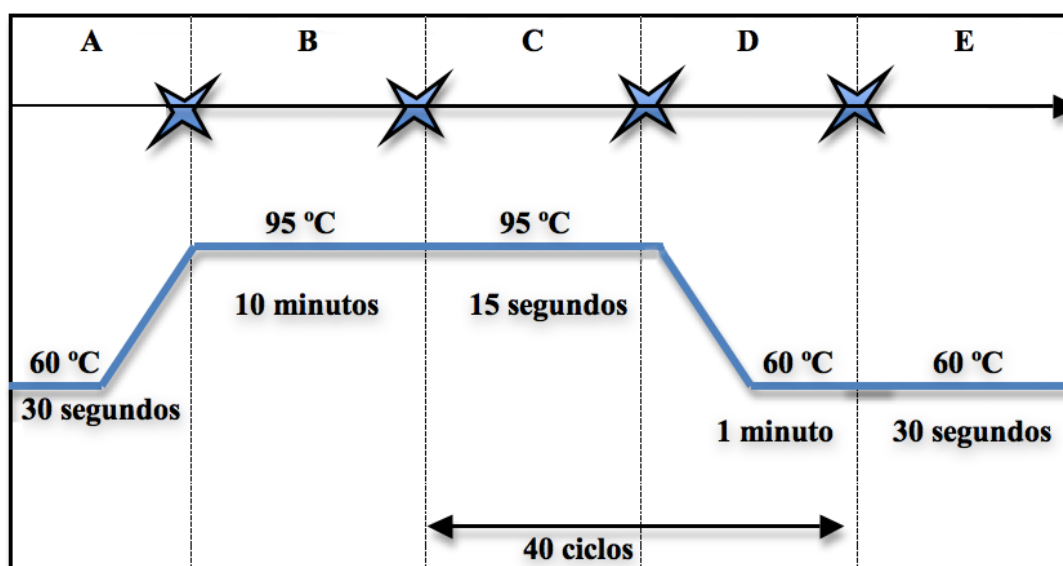


Figura 15. Esquema de las condiciones de la PCR a tiempo real para el genotipado de los polimorfismos rs35996865 (T>G) del gen *ROCK1*, rs2230774 (G>T) del gen *ROCK2* y rs978906 (T>C) del gen *ROCK2*. A: intervalo de pre-PCR; B: desnaturalización inicial; C: desnaturalización; D: anillamiento y elongación; E: elongación final.

## POLIMORFISMOS GENÉTICOS ESTUDIADOS

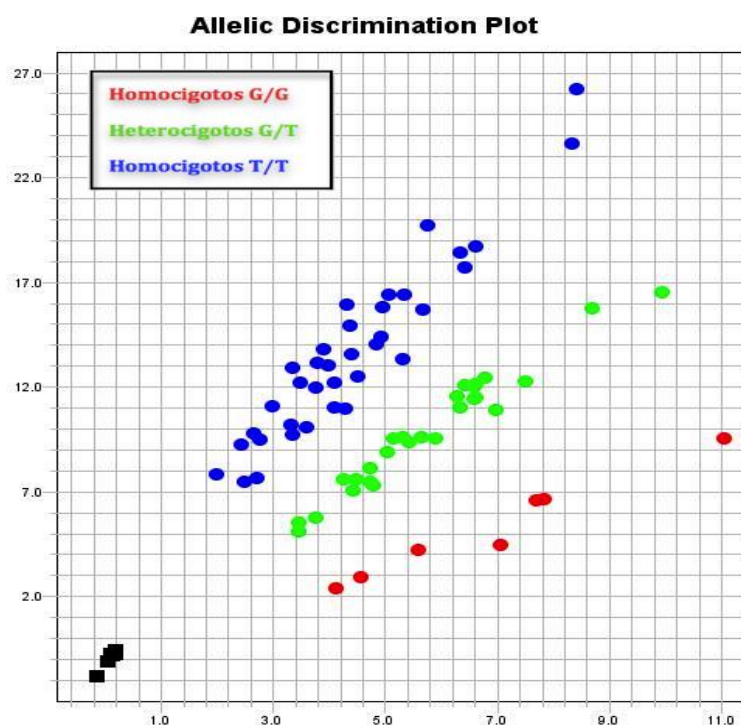
### Polimorfismo rs35996865 (T>G) del gen *ROCK1*.

Las condiciones utilizadas para el estudio del rs35996865 (T>G) del gen *ROCK1* mediante PCR a tiempo real se detallan en la tabla 6.

**Tabla 6. Condiciones empleadas para el estudio del polimorfismo rs35996865 (T>G) del gen *ROCK1*.**

Condiciones de la PCR		
Cebadores	Sentido	5'-ACCTGTAACCCAAGGAGATGTG-3'
	Antisentido	5'-CACAATTGGCAGGAAAGTGG-3'
Programa	1 ciclo	95 °C durante 10 minutos
	40 ciclos	95 °C y 60 °C durante 15 y 30 minutos respectivamente
	1 ciclo	95 °C y 60 °C durante 15 y 60 minutos respectivamente
Tamaño del fragmento	97 pb	

A continuación, se muestra un ejemplo de la gráfica de discriminación alélica obtenida tras el análisis de dicho polimorfismo (Figura 16).



**Figura 16. Representación gráfica de la discriminación alélica del polimorfismo rs35996865 (T>G) del gen *ROCK1*.** Cada nube de puntos de la gráfica representa a un genotipo concreto: los dos diferentes tipos de homocigotos en los extremos y el heterocigoto en el centro.

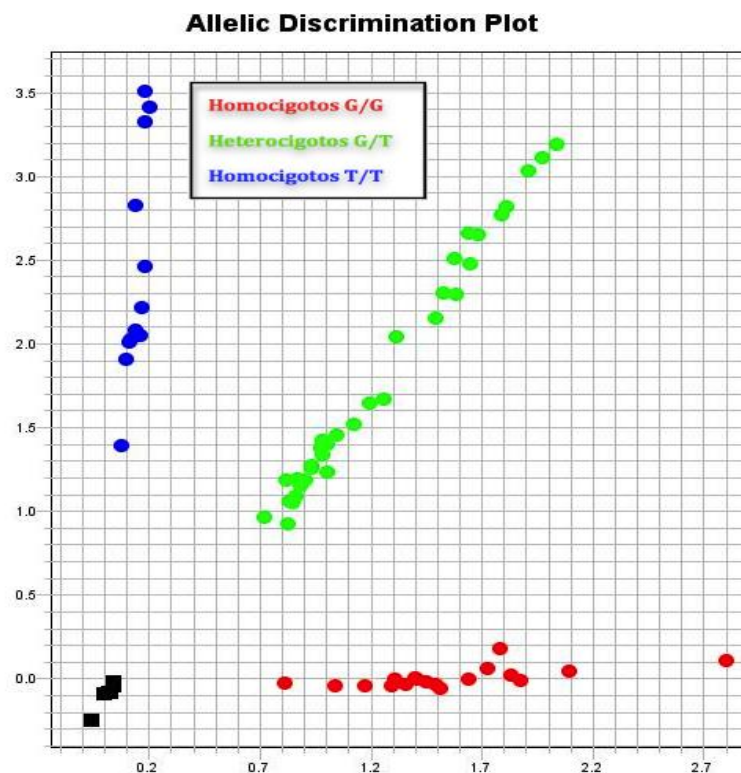
### Polimorfismo rs2230774 (G>T) del gen *ROCK2*.

Las condiciones utilizadas para el estudio del rs2230774 (G>T) del gen *ROCK2* mediante PCR a tiempo real se detallan en la tabla 7.

**Tabla 7. Condiciones empleadas para el estudio del polimorfismo rs2230774 (G>T) del gen *ROCK2*.**

Condiciones de la PCR		
Cebadores	Sentido	5'-AAGTGGGTTAGTCGGTTG-3'
	Antisentido	5'-GGCAGTTAGCTAGGTTTG-3'
Programa	1 ciclo	95 °C durante 10 minutos
	40 ciclos	95 °C y 60 °C durante 15 y 30 minutos respectivamente
	1 ciclo	95 °C y 60 °C durante 15 y 60 minutos respectivamente
Tamaño del fragmento	97 pb	

A continuación, se muestra un ejemplo de la gráfica de discriminación alélica obtenida tras el análisis de dicho polimorfismo (Figura 17).



**Figura 17. Representación gráfica de la discriminación alélica del polimorfismo rs2230774 (G>T) del gen *ROCK2*.**



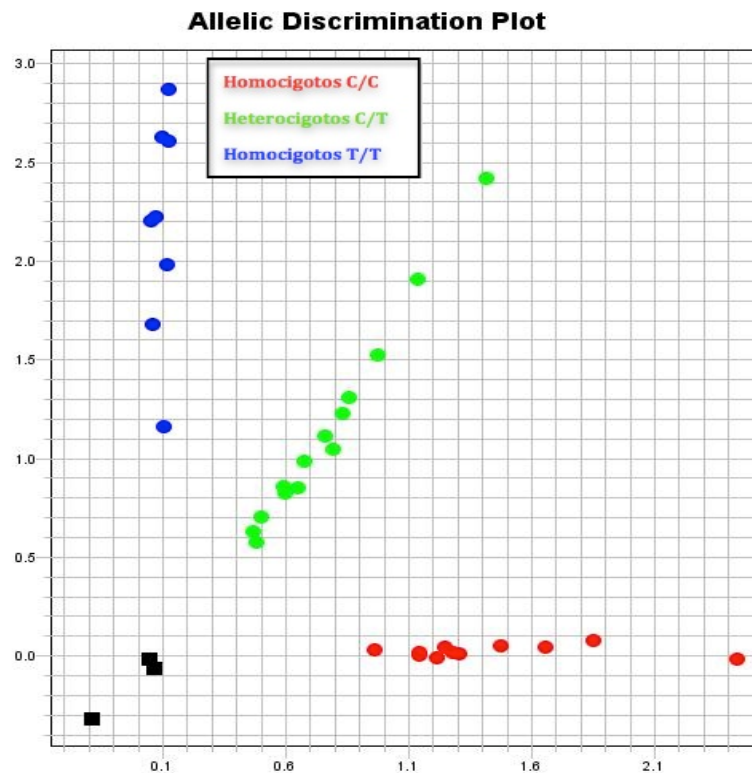
### Polimorfismo rs978906 (T>C) del gen *ROCK2*.

Las condiciones utilizadas para el estudio del rs978906 (T>C) del gen *ROCK2* mediante PCR a tiempo real se detallan en la tabla 8.

**Tabla 8. Condiciones empleadas para el estudio del polimorfismo rs978906 (T>C) del gen *ROCK2*.**

Condiciones de la PCR		
Cebadores	Sentido	5'-AAGTGGGTTAGTCGGTTG-3'
	Antisentido	5'-GGCAGTTAGCTAGGTTTG-3'
Programa	1 ciclo	95 °C durante 10 minutos
	40 ciclos	95 °C y 60 °C durante 15 y 30 minutos respectivamente
	1 ciclo	95 °C y 60 °C durante 15 y 60 minutos respectivamente
Tamaño del fragmento	97 pb	

A continuación, se muestra un ejemplo de la gráfica de discriminación alélica obtenida tras el análisis de dicho polimorfismo (Figura 18).



**Figura 18. Representación gráfica de la discriminación alélica del polimorfismo rs978906 (T>C) del gen *ROCK2*.**

## **MÉTODOS ESTADÍSTICOS.**

En nuestro trabajo, las variables cuantitativas se expresan mediante la media  $\pm$  desviación estándar (DE) y fueron comparadas mediante el test de la t de Student. Las variables cualitativas por otro lado, se presentan como frecuencias absolutas y relativas, siendo analizadas mediante el test de la  $\chi^2$ .

### **2.7. Análisis estadístico**

Las variables cuantitativas se presentan como media y DE y para su comparación se utilizó el test de la t de Student o el test de ANOVA en caso de que hubiera varias categorías. Las variables cualitativas se presentan como frecuencias absolutas y porcentajes y se utilizó el test de  $\chi^2$  para su análisis. La correlación entre variables cuantitativas se realizó mediante el test de la R de Pearson.

Para cada polimorfismo estudiado, se calculó en los controles la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg a través del test  $\chi^2$ . La asociación entre cada polimorfismo y la presencia de enfermedad se estudió asimismo mediante el test de la  $\chi^2$ , analizando la distribución de los genotipos mediante tablas de 3x2 y agrupando dichos datos en tablas 2x2 de frecuencia alélica y presencia alélica (comparando los portadores de un alelo frente al resto).<sup>149</sup> En el caso de que en las tablas 2x2 las frecuencias esperadas fueran menores a 5, utilizamos el test exacto de Fisher.

Para todos los polimorfismos se realizó el análisis comparativo de la distribución de las variantes genéticas estudiadas entre los pacientes alcohólicos frente a los controles sanos, pacientes alcohólicos con enfermedad hepática alcohólica frente a pacientes alcohólicos sin hepatopatía y pacientes alcohólicos con cirrosis frente a pacientes alcohólicos con hepatitis alcohólica.

Los análisis estadísticos descritos, así como los relativos a la descripción de las características de la muestra (pacientes y controles) se llevaron a cabo con el programa SPSS v21 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Se consideró significativo un valor de  $P < 0,05$ .

## **2.8. Financiación**

El estudio se realizó principalmente en el marco del proyecto “Estudio de la vía de las Rho-quinasas en la respuesta inflamatoria ligada al consumo excesivo de alcohol” código GRS 1199/A/15, financiado por la Gerencia Regional de Salud de Castilla y León dentro de la convocatoria de Proyectos de Investigación en Biomedicina, Biotecnología y Ciencias de la Salud 2015. El investigador principal de este proyecto es el Dr. Miguel Marcos Martín y el doctorando es investigador colaborador del mismo. Así mismo, partes de este trabajo han sido financiadas o realizadas en el marco de siguientes proyectos:

- GRS 1046/A/14 Análisis de la respuesta inflamatoria mediada por receptores tipo Toll tras el consumo intensivo de alcohol o binge drinking. Gerencia Regional de Salud de Castilla y León. Convocatoria de Proyectos de Investigación en Biomedicina, Biotecnología y Ciencias de la Salud 2014. IP: Miguel Marcos Martín.
- PI16/01548. Análisis del papel de las MAP quinasas en la activación del TLR-4 tras el consumo intensivo de alcohol o binge drinking. Instituto de Salud Carlos III. Acción Estratégica en Salud 2016. IP: Miguel Marcos Martín.

### 3. RESULTADOS

#### 1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS RHO-QUINASAS EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON INTOXICACIÓN ALCOHÓLICA AGUDA

##### Características de la muestra

Las características detalladas de esta muestra, así como los resultados del patrón de consumo de alcohol de la misma obtenidos gracias al cuestionario recogido en la tabla 2, se exponen en las tablas 9 y 10, que se muestran a continuación:

**Tabla 9. Características clínicas de los casos con intoxicación alcohólica aguda y de los controles.**

Variable	Casos (n=36)	Controles (n=26)	P
Edad (años)	20,11 (4,28)	23,38 (2,92)	< 0,001
Relación varón/mujer	19/17	9/17	0,156
AST (U/L)	26,34 (13,77)	17,72 (3,88)	0,003
ALT (U/L)	19,60 (14,67)	16,06 (6,44)	0,328
Cociente AST /ALT	1,46 (0,45)	1,21 (0,38)	0,051
GGT (U/L)	19,60 (15,59)	13,44 (5,27)	0,022
FA (U/L)	76,43 (35,93)	57,89 (19,20)	0,40
LDH (U/L)	227,53 (119,96)	163,33 (29,69)	0,001
Leucocitos/ $\mu$ L	8 903 (2 365)	8 001 (3 340)	0,027
Etanol en sangre (g/L)	2,35 (0,53)	0 (0)	< 0,001

Las variables cuantitativas se muestran como media y desviación estándar (DE). Las variables cualitativas se presentan en valor absoluto (%). La significación estadística ha sido calculada mediante el test  $\chi^2$  o el test de la t de Student. **AST**: aspartato aminotransferasa; **ALT**: alanina aminotransferasa; **GGT**:  $\gamma$ -glutamiltranspeptidasa, **FA**: fosfatasa alcalina, **LDH**: lactato deshidrogenasa.

**Tabla 10. Patrón de consumo de alcohol de los casos con intoxicación alcohólica aguda y de los controles.**

<b>Patrón de consumo</b>	<b>Casos (n=36)</b>	<b>Controles (n=26)</b>
Diariamente	0 (0)	0 (0)
Esporádicamente / Fines de semana	22 (61,11)	3 (11,53)
Casi nunca / nunca	3 (8,30)	23 (88,46)
Sin rellenar el cuestionario	11 (30,60)	0 (0)

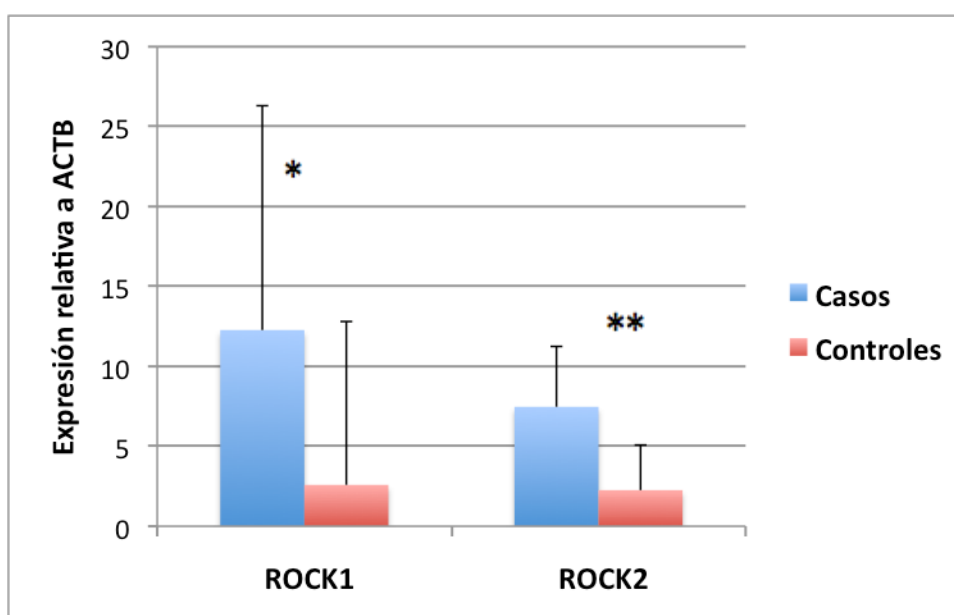
Los datos se muestran en valor absoluto (%).

A la pregunta, “¿Consumes otro tipo de drogas? ¿Cuáles? ¿Con qué frecuencia?”, solo tres de los encuestados reconocieron consumir otro tipo de drogas, concretamente cannabis, haciéndolo de forma puntual.

### **1.1. Expresión relativa del ARNm de ROCK1 y ROCK2 en sangre periférica**

Los resultados de la expresión relativa de ROCK1 y ROCK2 en sangre periférica de los casos y controles se muestran en la figura 19. Encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar la expresión de ROCK1 y ROCK2 ( $P < 0,001$  y  $P = 0,013$ , respectivamente) en la sangre de los pacientes recogida durante un episodio de intoxicación alcohólica respecto a los controles. A su vez, se detectó una fuerte correlación positiva entre la expresión de ROCK1 y ROCK2 ( $\rho = 0,666$ ) estadísticamente significativa ( $P < 0,001$ ), que fue mayor entre los pacientes sometidos a un episodio de intoxicación alcohólica ( $\rho = 0,781$ ,  $P < 0,001$ ).

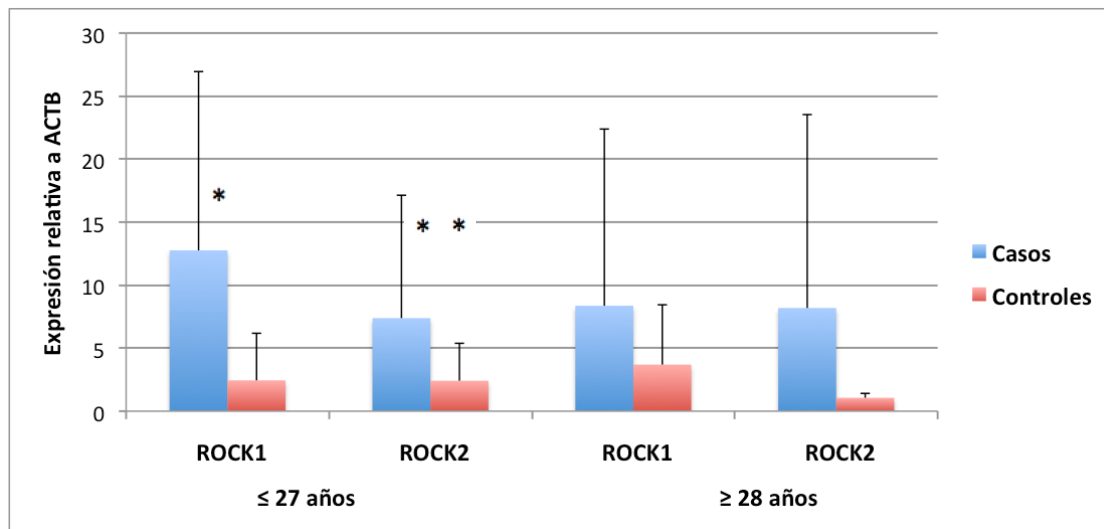
### Expresión de ROCK1 y ROCK2 en sangre periférica



**Figura 19. Expresión relativa de ROCK1 y ROCK2 en sangre periférica de pacientes con intoxicación alcohólica aguda y controles.** La expresión relativa de ARNm para cada grupo se expresa con la media del valor y la desviación estándar. Las expresiones relativas se normalizaron con actina- $\beta$  (ACTB) y se calibraron con la media  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  de los controles. La significación estadística se calculó mediante la prueba de U de Mann-Whitney para muestras independientes. \* $P < 0,01$ ; \*\* $P < 0,013$ .

#### 1.1.1. Influencia de la edad en la expresión relativa del ARNm de ROCK1 y ROCK2 en sangre periférica

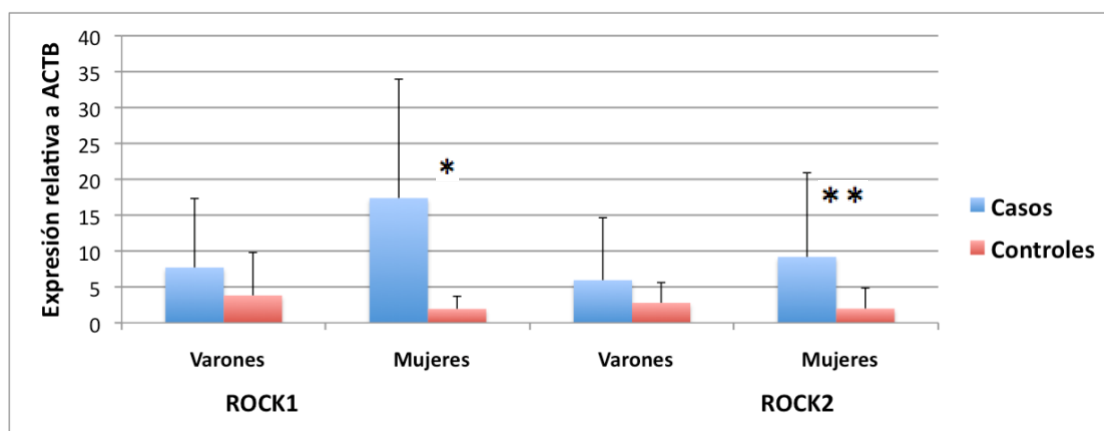
Al estratificar los datos anteriores en dos grupos etarios ( $\leq$  de 27 años y  $\geq$  de 28 años), hallamos también un aumento significativo de ambas isoformas entre los casos sometidos a un episodio de intoxicación alcohólica respecto a los controles. Sin embargo, solo obtuvimos resultados significativos en los pacientes con edad igual o inferior a los 27 años ( $P < 0,001$  y  $P < 0,05$  respectivamente).



**Figura 20. Expresión de ROCK1 y ROCK2 en sangre periférica de pacientes con intoxicación alcohólica aguda según edad.** (\* $P < 0,001$  y \*\* $P < 0,05$ , respectivamente). La significación estadística se calculó mediante la prueba de U de Mann-Whitney para muestras independientes.

#### 1.1.2. Influencia del sexo en la expresión relativa del ARNm de ROCK1 y ROCK2 en sangre periférica

Al estratificar los datos obtenidos en la muestra global, separándolos en función del sexo, encontramos un incremento de la expresión tanto de ROCK1 como de ROCK2 en ambos sexos al compararlo con los controles; si bien sólo fue estadísticamente significativo en el sexo femenino ( $P < 0,001$  y  $P < 0,05$  respectivamente).

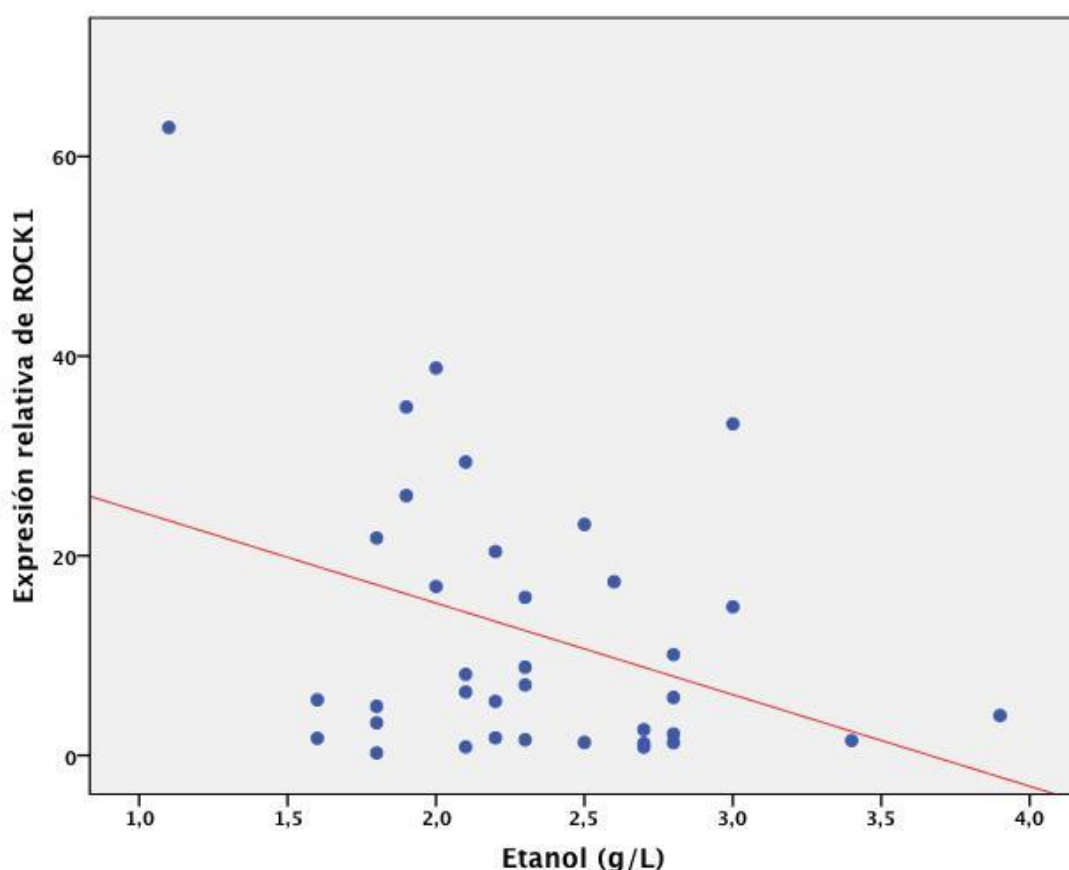


**Figura 21. Expresión de ROCK1 y ROCK2 en sangre periférica de pacientes con intoxicación alcohólica aguda según sexo.** (\* $P < 0,001$  y \*\* $P < 0,05$ , respectivamente). La significación estadística se calculó mediante la prueba de U de Mann-Whitney para muestras independientes.

## 2. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE ARNm DE RHO-QUINASAS, MEDIADORES INFLAMATORIOS Y TLR, Y NIVELES DE ETANOL

### 2.1 Correlación entre la expresión de ROCK1, ROCK2 y la alcoholemia

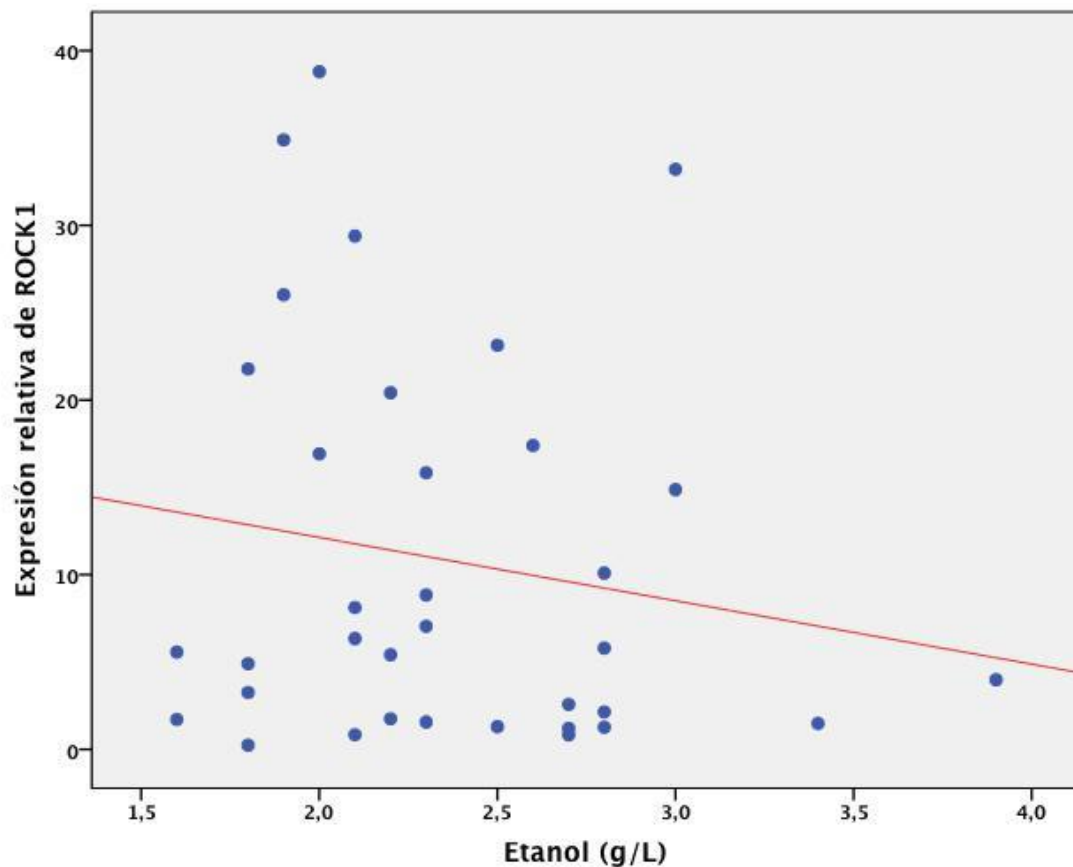
Al realizar un análisis de manera exclusiva sobre los casos, se establece una correlación negativa, estadísticamente significativa ( $r = -0,358$ ;  $P = 0,032$ ), entre los niveles de etanol en sangre con la expresión relativa de ROCK1. Dicha correlación negativa moderada y estadísticamente significativa también se encontró respecto a los niveles de ROCK2 ( $r = -0,412$ ;  $P = 0,013$ ).



**Figura 22.** Correlación entre la expresión de ROCK1 y la alcoholemia (g/L); casos. Hallamos una correlación negativa ( $r = -0,358$ ;  $P = 0,032$ ). La significación estadística se calculó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

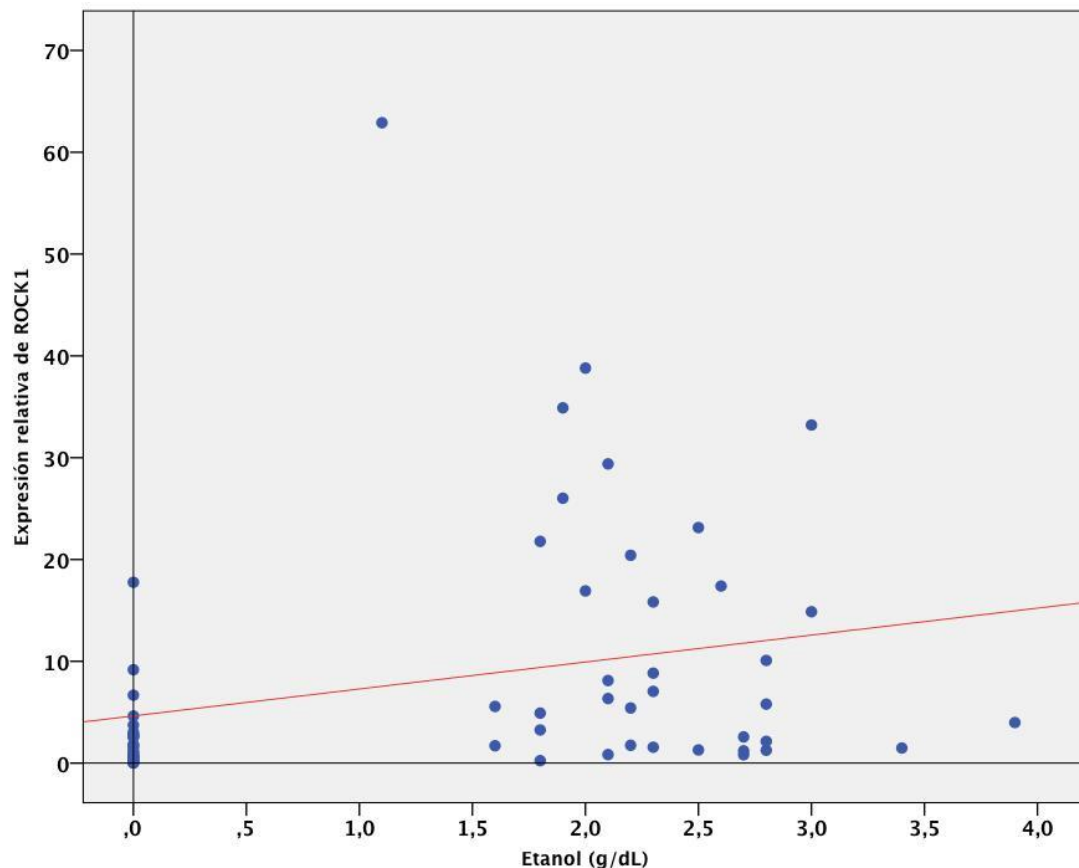


Sin embargo, si se excluye el valor *outlier* (situado en la parte superior izquierda de la figura 22), encontramos igualmente una correlación negativa pero no significativa para *ROCK1* ( $r = -0,167$ ;  $P = 0,340$ ). Igualmente, se constata una correlación negativa en el caso *ROCK2* ( $r = -0,268$ ;  $P = 0,120$ ), no significativa.



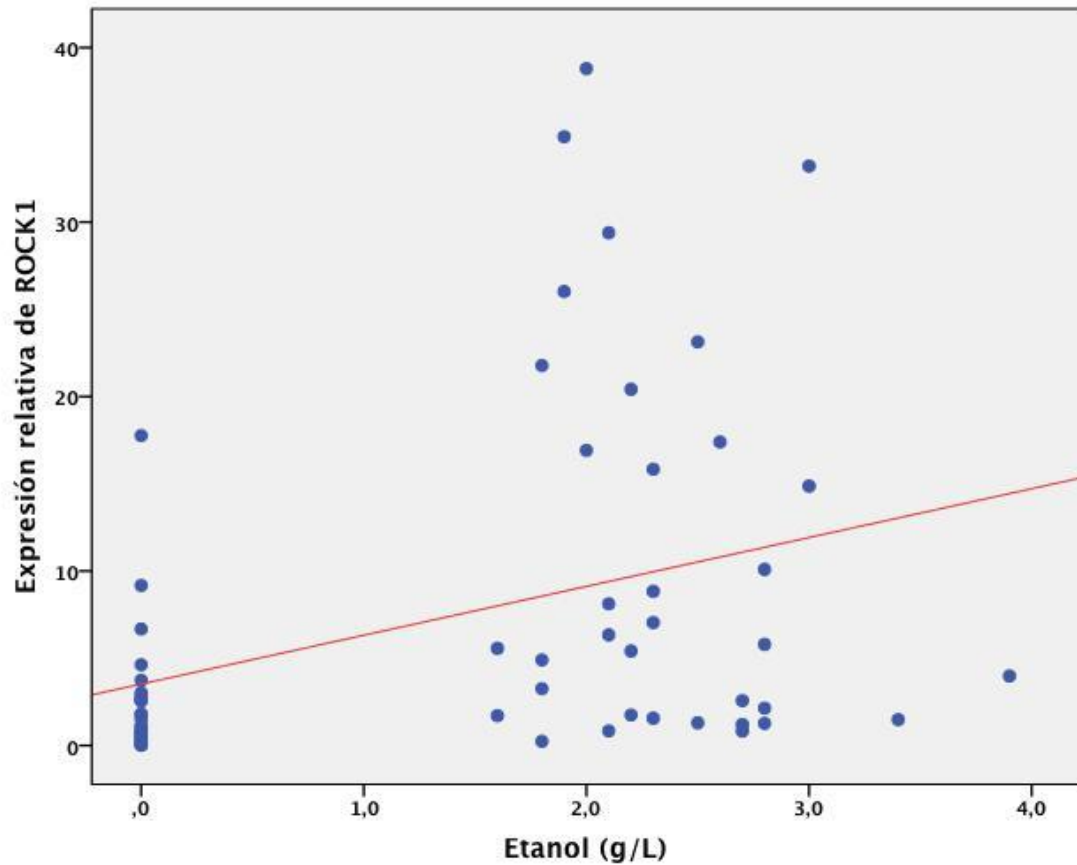
**Figura 23. Correlación entre la expresión de ROCK1 y la alcoholemia (g/L); casos excluyendo valor *outlier*.** Hallamos una correlación negativa ( $r = -0,167$ ;  $P = 0,340$ ). La significación estadística se calculó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Al realizar un análisis sobre toda la muestra (casos con intoxicación alcohólica y controles), se establece una correlación positiva entre los niveles de etanol en sangre con la expresión relativa de ROCK1, estadísticamente significativa ( $r = 0,273$ ;  $P = 0,032$ ). No se encontraron diferencias significativas respecto a los niveles de ROCK2 ( $r = 0,163$ ;  $P = 0,205$ ).



**Figura 24. Correlación entre la expresión de ROCK1 y la alcoholemia (g/L); muestra global** Hallamos una correlación positiva ( $r = 0,273$ ;  $P = 0,032$ ). La significación estadística se calculó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Al volver a analizar la muestra global de casos y controles, eliminando el valor *outlier*, encontramos también una correlación positiva estadísticamente significativa para ROCK1 ( $r = 0,358$ ;  $P = 0,005$ ) y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a ROCK2 ( $r = 0,207$ ;  $P = 0,110$ ).



**Figura 25. Correlación entre la expresión de ROCK1 y la alcoholemia (g/L); muestra global excluyendo el valor *outlier*.** Hallamos una correlación positiva estadísticamente significativa ( $r = 0,358$ ;  $P = 0,005$ ). La significación estadística se calculó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

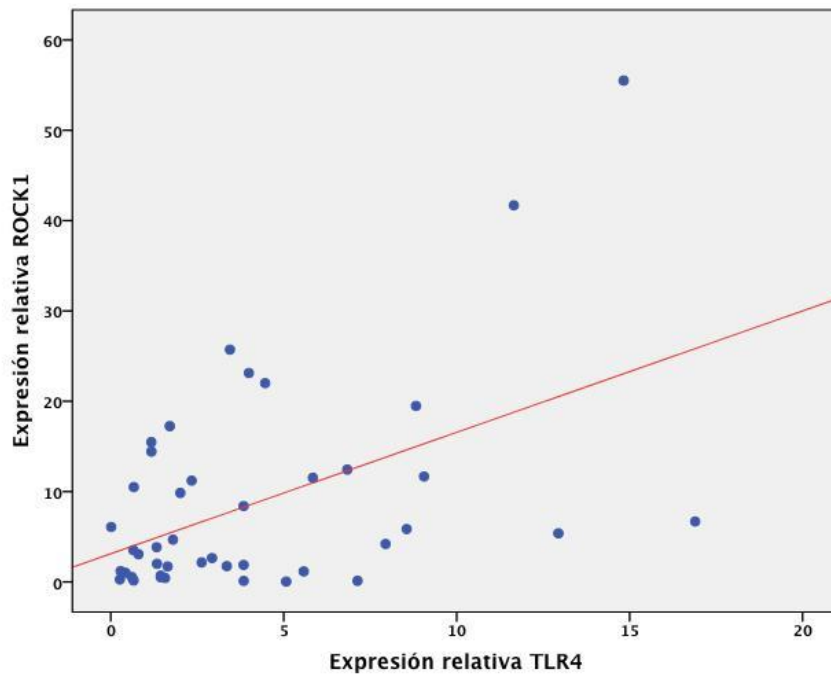
## 2.2. Correlación entre la expresión relativa de ARNm de ROCK1 y ROCK2 y la de TLR durante el episodio de intoxicación alcohólica

El conjunto de correlaciones entre los niveles de ARNm de TLR y las rho-quinasas se muestran en la tabla 11. Al analizar la expresión relativa de ROCK1 y ROCK2 y su relación con los niveles de TLR-1 y TLR-2, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En cambio, encontramos una correlación positiva estadísticamente significativa, entre la expresión relativa de ROCK1 y los niveles de TLR-4, tanto para el conjunto de la muestra global ( $r = 0,486, P = 0,001$ ) como para el análisis restringido solo a los casos ( $r = 0,423, P = 0,044$ ). Esta correlación se observa también con el análisis con ROCK2 en la muestra global ( $r = 0,493, P = 0,001$ ) y en los casos ( $r = 0,466, P = 0,024$ ). Sin embargo, en este último caso, el resultado varía hacia la no significación tras la eliminación de un valor *outlier* ( $r = 0,208, P = 0,351$ ).

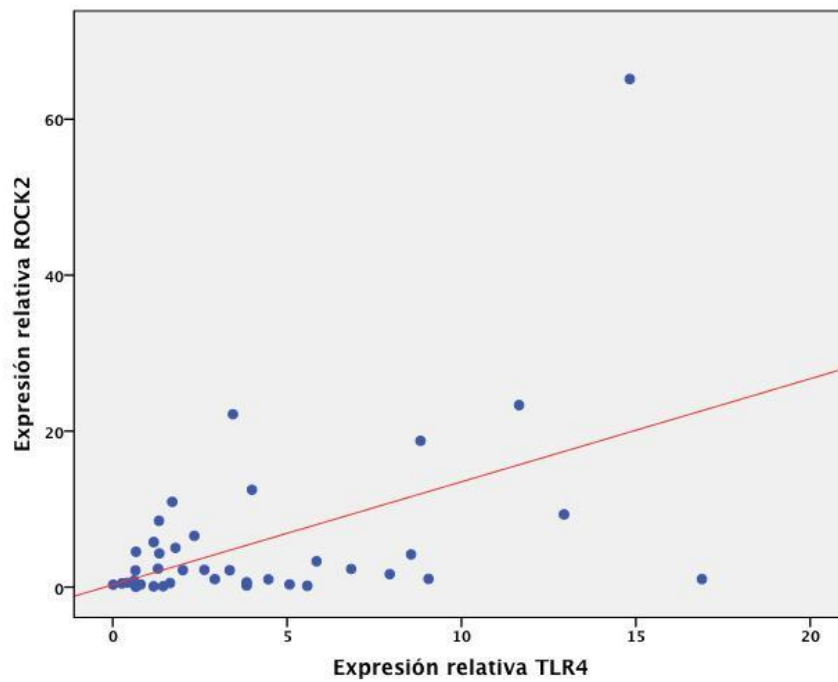
**Tabla 11. Correlaciones entre ROCK1/ROCK2 y TLRs**

<b>Isoforma ROCK</b>		<b>TLR1</b>	<b>TLR2</b>	<b>TLR4</b>
<b>ROCK1</b>	<b>Grupo global</b>	$r = 0,083 (P = 0,616)$	$r = 0,167 (P = 0,276)$	<b><math>r = 0,486 (P = 0,001)</math></b>
	<b>Casos</b>	$r = 0,038 (P = 0,874)$	$r = 0,067 (P = 0,760)$	<b><math>r = 0,423 (P = 0,044)</math></b>
	<b>Controles</b>	<b><math>r = 0,615 (P = 0,005)</math></b>	<b><math>r = 0,620 (P = 0,002)</math></b>	$r = 0,331 (P = 0,153)$
<b>ROCK2</b>	<b>Grupo global</b>	$r = -0,058 (P = 0,742)$	$r = 0,018 (P = 0,907)$	<b><math>r = 0,493 (P = 0,001)</math></b>
	<b>Casos</b>	$r = 0,034 (P = 0,887)$	$r = 0,056 (P = 0,797)$	<b><math>r = 0,466 (P = 0,024)</math></b>
	<b>Controles</b>	$r = 0,030 (P = 0,913)$	$r = 0,095 (P = 0,716)$	$r = 0,075 (P = 0,780)$

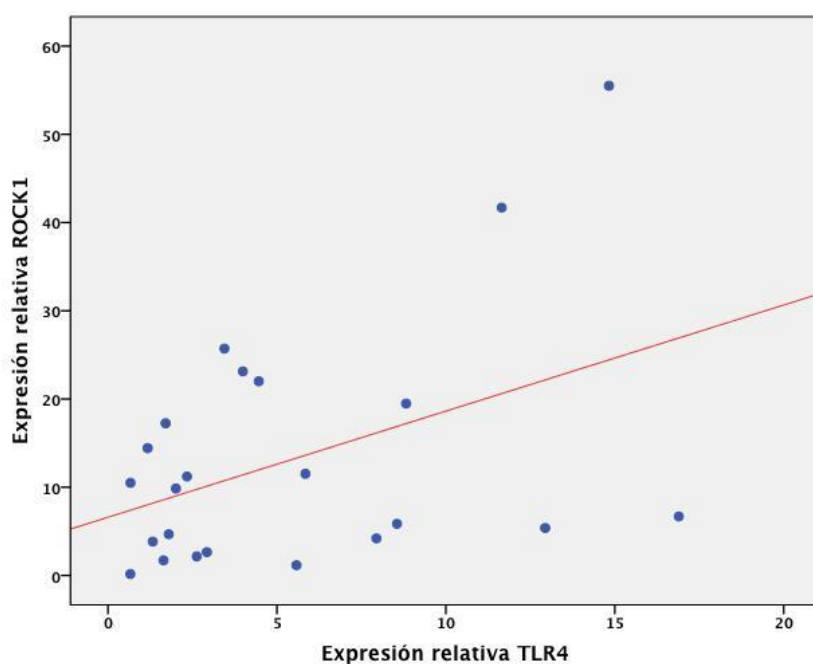
**r** = Coeficiente de correlación de Pearson. **P** = Significación estadística.



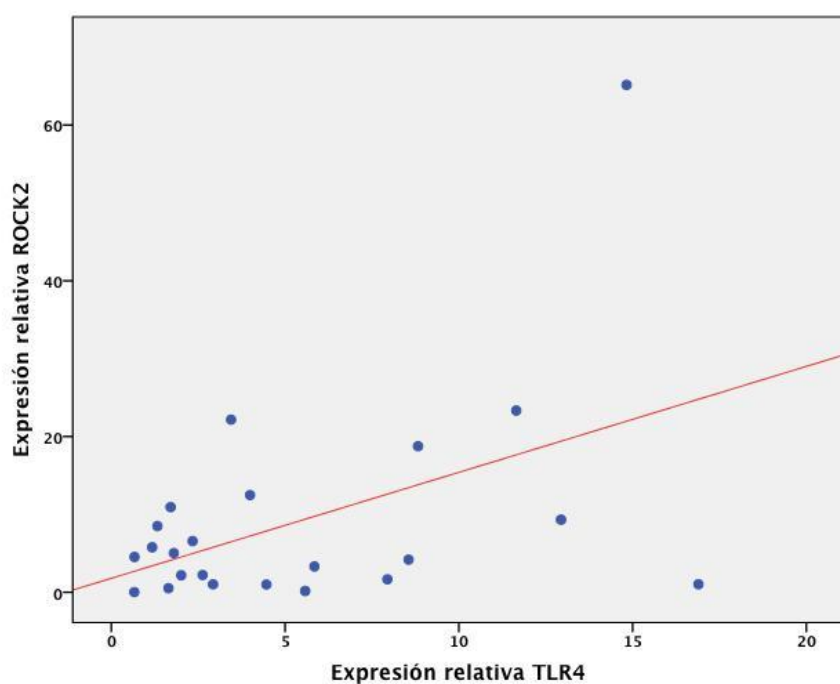
**Figura 26. Correlación entre la expresión de ROCK1 y el TLR-4; muestra global.** Hallamos una correlación positiva ( $r = 0,486$ ;  $P = 0,001$ ). La significación estadística se calculó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.



**Figura 27. Correlación entre la expresión de ROCK2 y el TLR-4; muestra global.** Hallamos una correlación positiva ( $r = 0,493$ ;  $P = 0,001$ ). La significación estadística se calculó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.



**Figura 28. Correlación entre la expresión de ROCK1 y el TLR4; casos.** Hallamos una correlación positiva ( $r = 0,423$ ;  $P = 0,044$ ). La significación estadística se calculó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.



**Figura 29. Correlación entre la expresión de ROCK2 y el TLR4; casos.** Hallamos una correlación positiva ( $r = 0,466$ ;  $P = 0,024$ ). La significación estadística se calculó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

### **2.3. Correlación entre la expresión relativa de ARNm de ROCK1 y ROCK2 y de citoquinas inflamatorias (IL1- $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ ) durante el episodio de intoxicación alcohólica**

Los resultados obtenidos tras el análisis del conjunto de correlaciones entre los niveles en sangre de ARNm de citoquinas inflamatorias y las rho-quinasas se muestran en la tabla 12. Al analizar la expresión relativa de ROCK1 y ROCK2 y su relación con los niveles de TNF- $\alpha$ , no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, ni en la muestra global, ni al seleccionar los casos. Sin embargo, sí que se obtiene una correlación positiva entre ROCK1 y el TNF- $\alpha$  en el grupo control ( $r = 0,569$ ,  $P = 0,007$ ).

Por otro lado, hallamos una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre la expresión relativa de ARNm de ROCK1 y de IL1- $\beta$  e IL-8. Este hallazgo se mantiene tanto en el grupo global de ROCK1 para la IL1- $\beta$  ( $r = 0,443$ ,  $P = 0,003$ ) e IL-8 ( $r = 0,562$ ,  $P = 0,001$ ) como para los el análisis exclusivo de los casos ( $r = 0,423$ ,  $P = 0,044$ ) y ( $r = 0,483$ ,  $P = 0,023$ ) para la IL1- $\beta$  e IL-8 respectivamente. Sin embargo, la inspección de la gráfica de correlación nos indica la existencia de un claro valor *outlier*, cuya eliminación ofrece los resultados mostrados en la Tabla 13. La única correlación de las mencionadas que se mantiene sería la obtenida entre ROCK1 y la IL-8 en el análisis de la muestra global y los casos, con una correlación positiva fuerte ( $r = 0,793$ ,  $P = 0,001$ ) en esa última condición.

En el caso de ROCK2, encontramos una correlación positiva, tanto en el grupo global como en el análisis de los casos respecto a la IL1- $\beta$  ( $r = 0,496$ ,  $P = 0,002$ ) y ( $r = 0,466$ ,  $P = 0,025$ ) respectivamente. Esta significación se pierde al realizar de nuevo el análisis eliminado un valor *outlier*. Respecto al análisis de ROCK2 con la IL-8, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en el análisis de los casos ( $r = 0,304$ ,  $P = 0,169$ ). Sin embargo, al eliminar el valor *outlier*, hallamos una correlación positiva fuerte significativa ( $r = 0,856$ ,  $P = 0,001$ ).

**Tabla 12. Correlaciones entre ROCK1/ROCK2 y citoquinas inflamatorias**

Isoforma ROCK		IL1- $\beta$	IL-8	TNF- $\alpha$
ROCK1	Grupo global	$r = 0,443$ ( $P = 0,003$ )	$r = 0,562$ ( $P = 0,001$ )	$r = 0,025$ ( $P = 0,874$ )
	Casos	$r = 0,423$ ( $P = 0,044$ )	$r = 0,483$ ( $P = 0,023$ )	$r = 0,013$ ( $P = 0,955$ )
	Controles	$r = -0,161$ ( $P = 0,511$ )	$r = 0,256$ ( $P = 0,305$ )	$r = 0,569$ ( $P = 0,007$ )
ROCK2	Grupo global	$r = 0,496$ ( $P = 0,002$ )	$r = 0,386$ ( $P = 0,018$ )	$r = -0,153$ ( $P = 0,351$ )
	Casos	$r = 0,466$ ( $P = 0,025$ )	$r = 0,304$ ( $P = 0,169$ )	$r = -0,104$ ( $P = 0,645$ )
	Controles	$r = -0,226$ ( $P = 0,437$ )	$r = 0,130$ ( $P = 0,644$ )	$r = 0,151$ ( $P = 0,564$ )

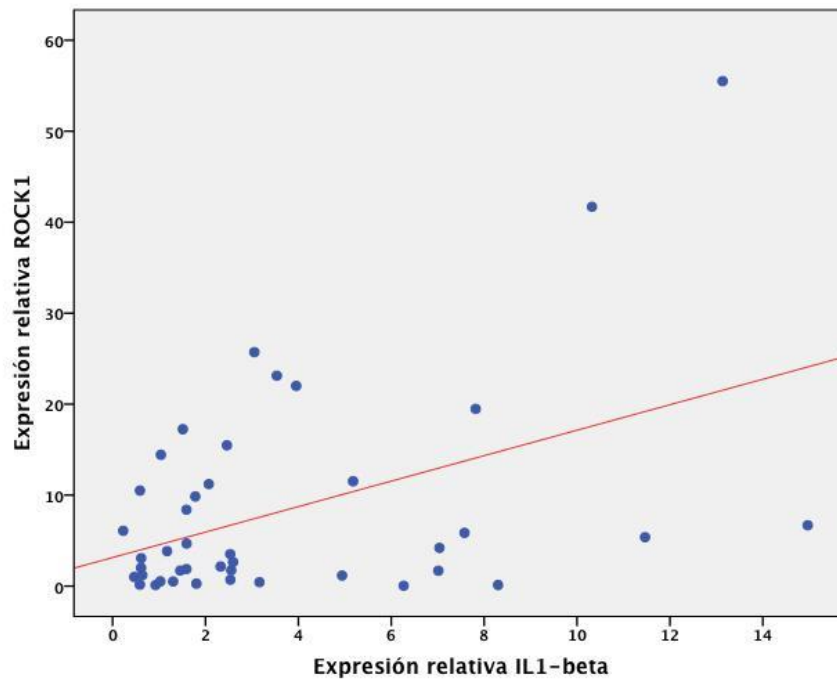
$r$  = Coeficiente de correlación de Pearson.  $P$  = Significación estadística. IL= Interleucina. TNF = Factor de necrosis tumoral.

**Tabla 13. Correlaciones entre ROCK1/ROCK2 y citoquinas inflamatorias sin el valor outlier**

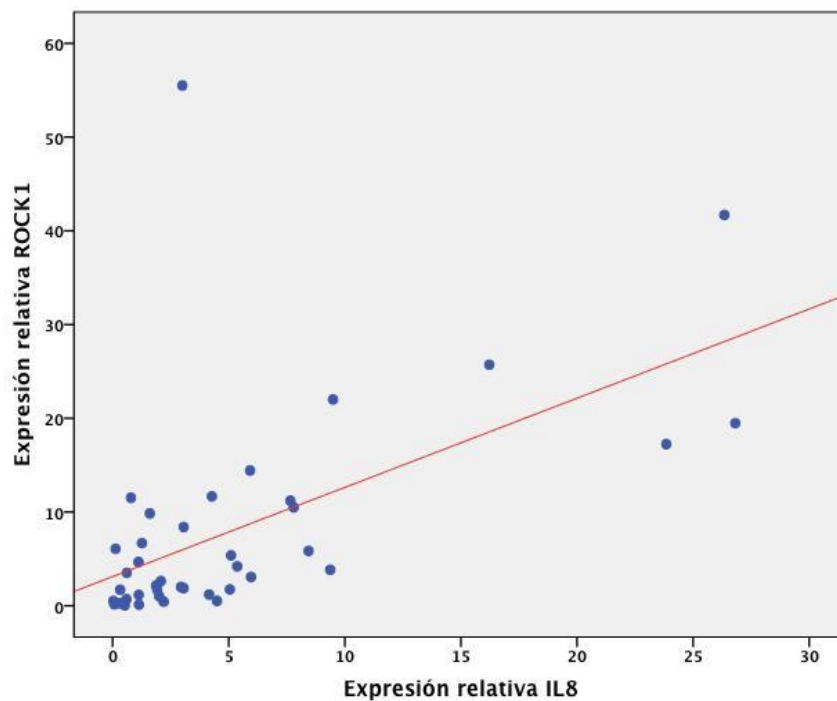
Isoforma ROCK		IL1- $\beta$	IL-8	TNF- $\alpha$
ROCK1	Grupo global	$r = 0,260$ ( $P = 0,100$ )	$r = 0,803$ ( $P = 0,001$ )	$r = 0,140$ ( $P = 0,377$ )
	Casos	$r = 0,199$ ( $P = 0,374$ )	$r = 0,793$ ( $P = 0,001$ )	$r = 0,211$ ( $P = 0,358$ )
	Controles	$r = -0,161$ ( $P = 0,511$ )	$r = 0,256$ ( $P = 0,305$ )	$r = 0,569$ ( $P = 0,007$ )
ROCK2	Grupo global	$r = 0,292$ ( $P = 0,083$ )	$r = 0,862$ ( $P = 0,001$ )	$r = -0,134$ ( $P = 0,421$ )
	Casos	$r = 0,208$ ( $P = 0,352$ )	$r = 0,856$ ( $P = 0,001$ )	$r = 0,071$ ( $P = 0,759$ )
	Controles	$r = -0,226$ ( $P = 0,437$ )	$r = 0,130$ ( $P = 0,644$ )	$r = 0,151$ ( $P = 0,564$ )

$r$  = Coeficiente de correlación de Pearson.  $P$  = Significación estadística. IL= Interleucina. TNF = Factor de necrosis tumoral.

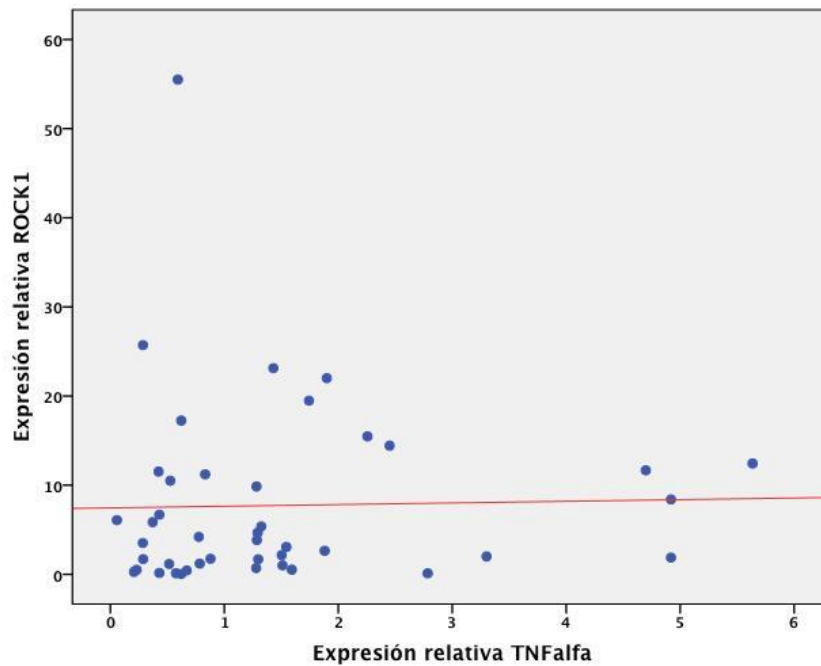




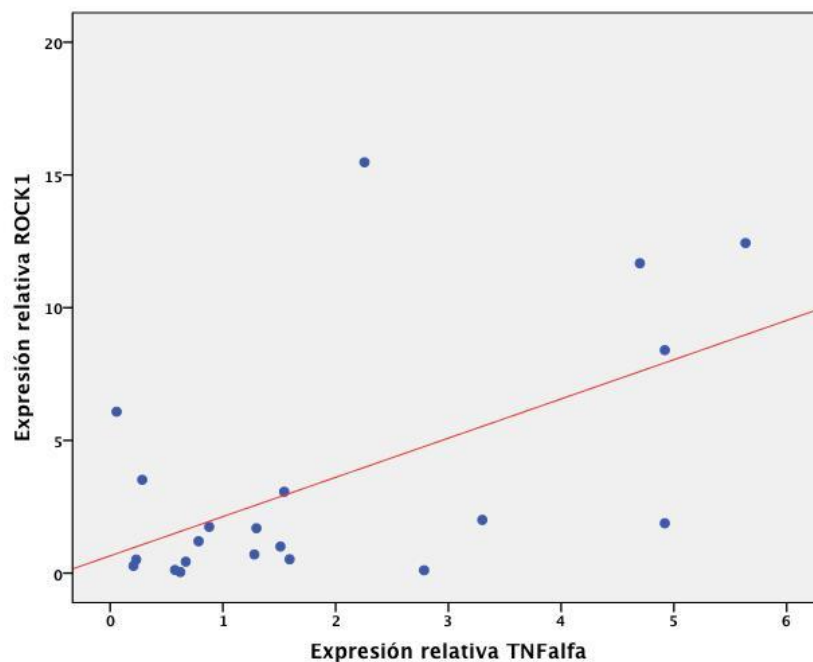
**Figura 30. Correlación entre la expresión de ROCK1 y la IL1-  $\beta$ ; muestra global.** Hallamos una correlación positiva ( $r = 0,443$ ;  $P = 0,003$ ). La significación estadística se calculó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.



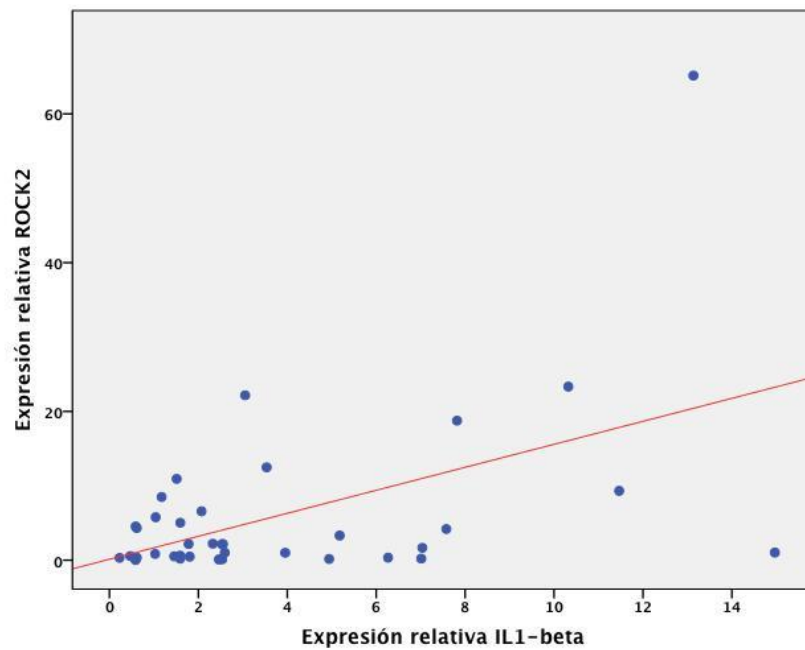
**Figura 31. Correlación entre la expresión de ROCK1 y la IL-8; muestra global.** Hallamos una correlación positiva ( $r = 0,562$ ;  $P = 0,001$ ). La significación estadística se calculó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.



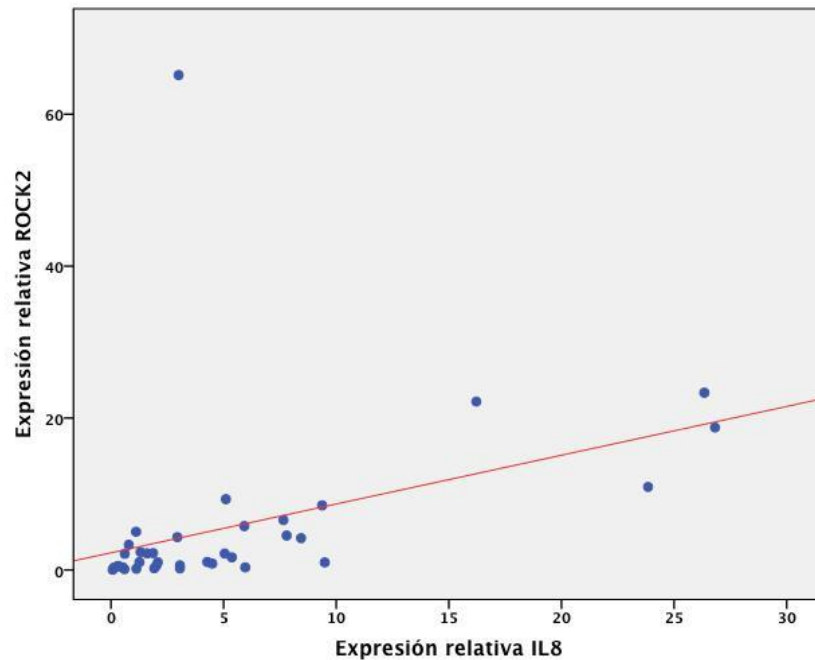
**Figura 32. Correlación entre la expresión de ROCK1 y la TNF- $\alpha$ ; muestra global.** Hallamos una correlación positiva no significativa ( $r = 0,025$ ;  $P = 0,874$ ). La significación estadística se calculó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.



**Figura 33. Correlación entre la expresión de ROCK1 y el TNF- $\alpha$ ; controles.** Hallamos una correlación positiva fuerte ( $r = 0,569$ ;  $P = 0,007$ ). La significación estadística se calculó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.



**Figura 34. Correlación entre la expresión de ROCK2 y la IL1-  $\beta$ ; muestra global.** Hallamos una correlación positiva ( $r = 0,496$ ;  $P = 0,002$ ). La significación estadística se calculó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

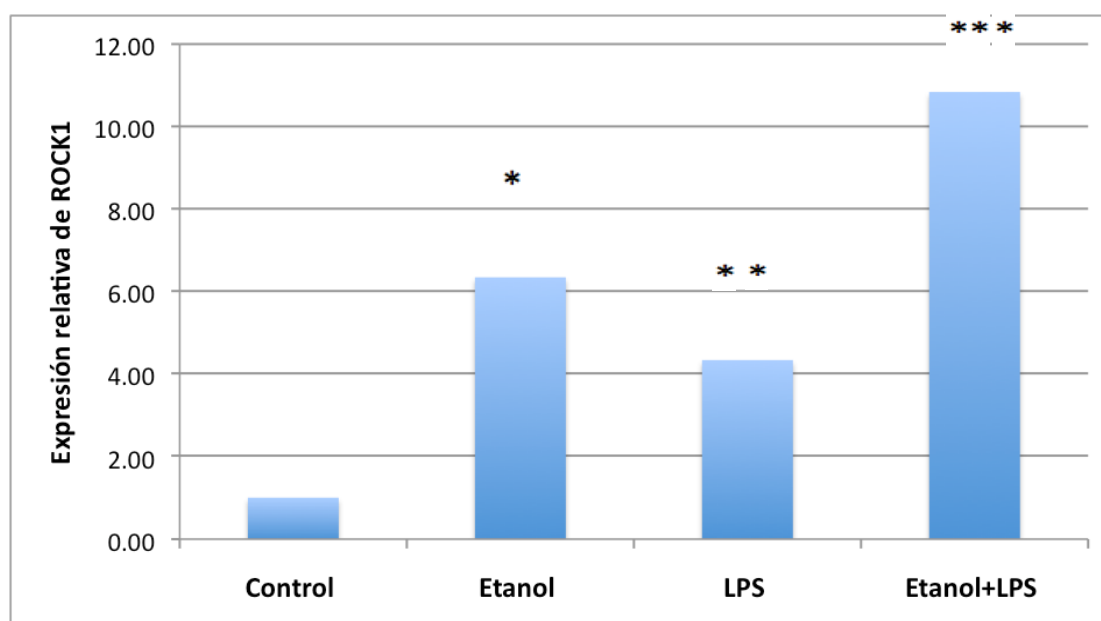


**Figura 35. Correlación entre la expresión de ROCK2 y la IL-8; muestra global.** Hallamos una correlación positiva ( $r = 0,386$ ;  $P = 0,018$ ). La significación estadística se calculó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

### 3. EXPRESIÓN DE RHO-QUINASAS EN UN MODELO CELULAR *IN VITRO* TRAS LA EXPOSICIÓN A ETANOL

#### 3.1. Expresión de rho-quinasas en células mononucleadas de sangre periférica expuestas a etanol

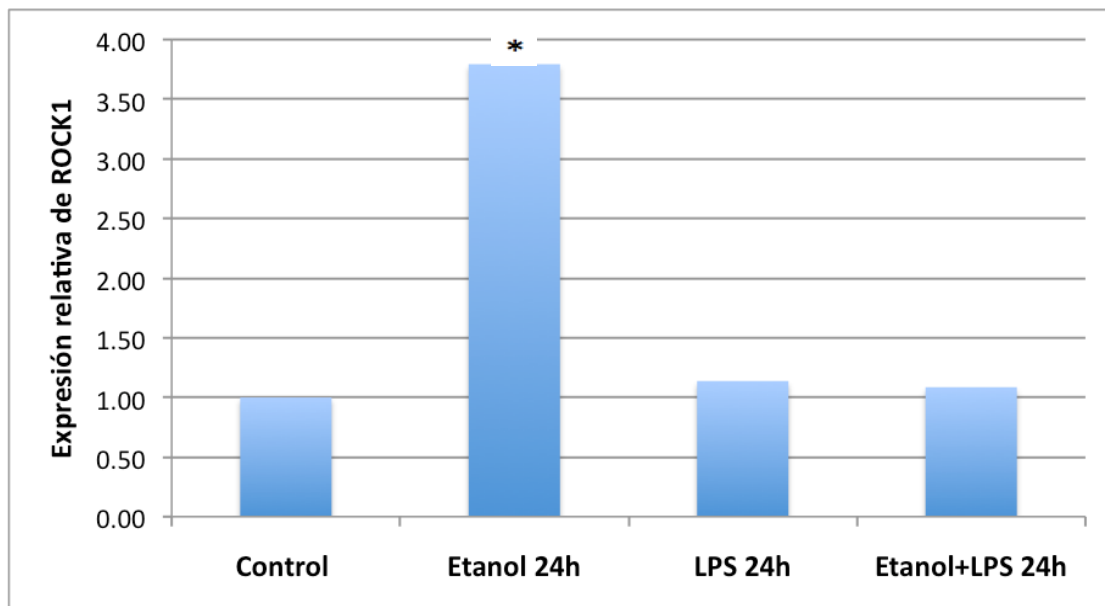
Al analizar la expresión de las rho-quinasas en CMSP en controles sanos tras exposición *in vitro* con etanol, LPS, y su combinación; encontramos diferencias significativas respecto a la expresión de ROCK1 y las tres condiciones anteriormente expuestas ( $P=0,033$ ;  $P=0,033$ ;  $P=0,002$ , respectivamente). Como podemos observar en la figura 36, la expresión de ROCK1 es superior cuando se da la condición conjunta de etanol y LPS. No encontramos expresión de ROCK2 en las células mononucleadas de sangre periférica expuestas a etanol o cualquier otra de las condiciones.



**Figura 36. Expresión de ROCK1 en CMSP de controles sanos intoxicadas con etanol *in vitro*.** (\* $P < 0,033$ ; \*\* $P < 0,033$  y \*\*\* $P < 0,002$ , respectivamente). Las células fueron expuestas a etanol (6 horas), LPS (1 hora) y etanol + LPS (6 horas/1 hora). La significación estadística se calculó mediante la prueba de la t de Student para muestras independientes.

### 3.2. Expresión de rho-quinasas en astrocitos de ratón expuestos a etanol

Al realizar el análisis de la expresión de las rho-quinasas en astrocitos de ratón, encontramos diferencias significativas entre los niveles de ROCK1 y las muestras intoxicadas *in vitro* con etanol, ( $P=0,032$ ). No hallamos diferencias relevantes en los niveles de ROCK1 con el LPS o con la combinación etanol/LPS.



**Figura 37. Expresión de ROCK1 en astrocitos de ratón expuestos a etanol.** (\* $P = 0,032$ ). Las células fueron expuestas a etanol (24 horas), LPS (1 hora) y etanol + LPS (24 horas/1 hora). La significación estadística se calculó mediante la prueba de la t de Student para muestras independientes.

## 4. ASOCIACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LAS RHO-QUINASAS Y LA PRESENCIA DE ENFERMEDAD ASOCIADA AL CONSUMO DE ALCOHOL

### 4.1. Polimorfismo rs35996865 del gen *ROCK1*

Los resultados obtenidos al analizar el polimorfismo rs35996865 del gen *ROCK1* se muestran en las tablas 14 y 15. El análisis de distribución genotípica muestra diferencias, en el límite de la significación estadística ( $P = 0,05$ ), entre los pacientes con consumo excesivo de alcohol que desarrollaron enfermedad hepática alcohólica y los pacientes alcohólicos sin hepatopatía, diferencia que no se replicó en el análisis de presencia alélica o de frecuencias alélicas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a la distribución de los genotipos o los alelos entre los grupos de alcohólicos y el grupo de los controles ni entre los paciente que desarrollaron cirrosis hepática alcohólica (CHA) frente a los pacientes que desarrollaron hepatitis alcohólica (HA). Las frecuencias genotípicas en controles cumplieron el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 0,511$ ;  $p = 0,474$ ).

**Tabla 14. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs35996865 del gen *ROCK1*.**

Grupo	Individuos	Frecuencias genotípicas (%)		
		TT	GT	GG
<b>Total</b>	622	353 (56,8%)	230 (37%)	39 (6,2%)
<b>Alcohólicos</b>	405	231 (57%)	146 (36,1%)	28 (6,9%)
<b>Sin EHA</b>	201	108 (53,7%)	83 (41,3%)	10 (5%)
<b>Con EHA</b>	204	123 (60,3%)	63 (30,9%)	18 (8,8%)
<b>Cirrosis</b>	99	57 (57,6%)	36 (36,4%)	6 (6,1%)
<b>Hepatitis</b>	105	66 (62,9%)	27 (25,7%)	12 (11,4%)
<b>Controles</b>	217	122 (56,2%)	84 (38,7%)	11 (5,1%)

**EHA:** Enfermedad hepática alcohólica. Alcohólicos frente a controles ( $P = 0,590$ ). Alcohólicos con EHA frente a alcohólicos sin EHA ( $P = 0,050$ ). Alcohólicos con cirrosis frente a hepatitis alcohólica ( $P = 0,152$ ).

**Tabla 15. Distribución y presencia alélica del polimorfismo rs35996865 del gen *ROCK1*.**

Grupo	Individuos	Presencia alélica (%)		Frecuencia alélica (%)	
		GT + TT	GT + GG	Alelo G	Alelo T
<b>Total</b>	622	582 (93,6%)	270 (43,4%)	308 (24,8%)	936 (75,2%)
<b>Alcohólicos</b>	405	376 (92,8%)	175 (43,2%)	202 (25%)	608 (75%)
<b>Sin EHA</b>	201	191 (95%)	94 (46,8%)	103 (25,6%)	299 (74,4%)
<b>Con EHA</b>	204	185 (90,7%)	81 (39,7%)	99 (24,3%)	309 (75,7%)
<b>Cirrosis</b>	99	93 (94%)	42 (42,4%)	48 (24,2%)	150 (75,8%)
<b>Hepatitis</b>	105	92 (87,6%)	39 (37,1%)	51 (24,3%)	159 (75,7%)
<b>Controles</b>	217	206 (94,9%)	95 (43,8%)	106 (24,4%)	328 (75,6%)

**EHA:** Enfermedad hepática alcohólica. Alcohólicos frente a controles ( $P = 0,952$ ). Alcohólicos con EHA frente a alcohólicos sin EHA ( $P = 0,655$ ). Alcohólicos con cirrosis frente a hepatitis alcohólica ( $P = 0,812$ ).

#### **4.2. Polimorfismo rs2230774 del gen *ROCK2***

Los resultados obtenidos al analizar el polimorfismo rs2230774 del gen *ROCK2* en relación con la presencia de hepatopatía o alcoholismo se muestran en las tablas 16 y 17. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a la distribución de los genotipos o los alelos entre los grupos de alcohólicos y el grupo de los controles ( $P = 0,745$ ). A su vez, no se observaron diferencias significativas entre los pacientes con consumo excesivo de alcohol que desarrollaron enfermedad hepática alcohólica y los que no ( $P = 0,401$ ). Por último, dentro del grupo de los pacientes con EHA, no se hallaron diferencias significativas entre los paciente que desarrollaron CHA o los pacientes que desarrollaron hepatitis alcohólica HA ( $P = 0,174$ ).

**Tabla 16. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2230774 del gen *ROCK2*.**

Grupo	Individuos	Frecuencias genotípicas (%)		
		TT	GT	GG
<b>Total</b>	632	170 (26,9%)	323 (51,1%)	139 (22%)
<b>Alcohólicos</b>	412	113 (27,4%)	206 (50%)	93 (22,6%)
<b>Sin EHA</b>	204	62 (30,4%)	97 (47,5%)	45 (22,1%)
<b>Con EHA</b>	208	51 (24,5%)	109 (52,4%)	48 (23,1%)
<b>Cirrosis</b>	102	28 (27,5%)	56 (54,9%)	18 (17,6%)
<b>Hepatitis</b>	106	23 (21,7%)	53 (50%)	30 (28,3%)
<b>Controles</b>	220	57 (25,9%)	117 (53,2%)	46 (20,9%)

EHA: Enfermedad hepática alcohólica. Alcohólicos frente a controles ( $P = 0,745$ ). Alcohólicos con EHA frente a alcohólicos sin EHA ( $P = 0,401$ ). Alcohólicos con cirrosis frente a hepatitis alcohólica ( $P = 0,174$ ).

**Tabla 17. Distribución y presencia alélica del polimorfismo rs2230774 del gen *ROCK2*.**

Grupo	Individuos	Presencia alélica (%)		Frecuencia alélica (%)	
		GT + TT	GT + GG	Alelo G	Alelo T
<b>Total</b>	632	493 (78%)	462 (73,1%)	601 (47,5%)	663 (52,5%)
<b>Alcohólicos</b>	412	319 (77,4%)	299 (72,6%)	392 (47,6%)	432 (52,4%)
<b>Sin EHA</b>	204	159 (77,9%)	142 (69,6%)	187 (45,8%)	221 (54,2%)
<b>Con EHA</b>	208	160 (76,9%)	157 (75,5%)	205 (49,3)	211 (50,7%)
<b>Cirrosis</b>	102	84 (82,4%)	74 (72,5%)	92 (45,1%)	112 (54,9%)
<b>Hepatitis</b>	106	76 (71,7%)	83 (78,3%)	113 (53,3%)	99 (46,7%)
<b>Controles</b>	220	174 (79,1%)	163 (74,1%)	209 (47,5%)	231 (52,5%)

EHA: Enfermedad hepática alcohólica. Alcohólicos frente a controles ( $P = 0,997$ ). Alcohólicos con EHA frente a alcohólicos sin EHA ( $P = 0,322$ ). Alcohólicos con cirrosis frente a hepatitis alcohólica ( $P = 0,339$ ).

La distribución de los genotipos de este polimorfismo en los controles sanos no se aleja del cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 0,967$ ;  $p = 0,325$ ).



### 4.3. Polimorfismo rs978906 del gen *ROCK2*

Los frecuencias genotípicas obtenidas al analizar el polimorfismo rs978906 del gen *ROCK2* se muestran en la tabla 18. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a la distribución de los genotipos entre los grupos de alcohólicos y el grupo de los controles. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los pacientes que desarrollaron EHA y los que no o entre los paciente que desarrollaron CHA o los pacientes que desarrollaron HA.

**Tabla 18. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs978906 del gen *ROCK2*.**

Grupo	Individuos	Frecuencias genotípicas (%)		
		TT	CT	CC
<b>Total</b>	616	152 (24,7%)	309 (50,2%)	155 (25,1%)
<b>Alcohólicos</b>	399	104 (26,1%)	201 (50,4%)	94 (23,5%)
<b>Sin EHA</b>	203	52 (25,6%)	101 (49,8%)	50 (24,6%)
<b>Con EHA</b>	196	52 (26,5%)	100 (51%)	44 (22,4%)
<b>Cirrosis</b>	100	23 (23%)	55 (55%)	22 (22%)
<b>Hepatitis</b>	96	29 (30,2%)	45 (46,9%)	22 (22,9%)
<b>Controles</b>	217	48 (22,1%)	108 (49,8%)	61 (28,1%)

EHA: Enfermedad hepática alcohólica. Alcohólicos frente a controles ( $P = 0,358$ ). Alcohólicos con EHA frente a alcohólicos sin EHA ( $P = 0,876$ ). Alcohólicos con cirrosis frente a hepatitis alcohólica ( $P = 0,447$ ).

Las frecuencias genotípicas en controles cumplían el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 0$ ;  $p = 0,988$ ).

En la tabla 19 se muestran los resultados del análisis del polimorfismo respecto a la distribución de alelos entre los grupos de alcohólicos y el grupo de los controles. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los subgrupos estudiados.

**Tabla 19. Distribución y presencia alélica del polimorfismo rs978906 del gen *ROCK2*.**

Grupo	Individuos	Presencia alélica (%)		Frecuencia alélica (%)	
		CT + TT	CT + CC	Alelo C	Alelo T
<b>Total</b>	616	459 (74,5%)	459 (74,5%)	619 (50,2%)	613 (49,8%)
<b>Alcohólicos</b>	399	303 (75,9%)	290 (72,7%)	389 (48,7%)	409 (51,3%)
<b>Sin EHA</b>	203	153 (75,4%)	150 (81,3%)	201 (49,5%)	205 (50,5%)
<b>Con EHA</b>	196	150 (76,5%)	140 (71,4%)	188 (48%)	204 (52%)
<b>Cirrosis</b>	100	78 (78%)	77 (77%)	99 (49,5%)	101 (50,5%)
<b>Hepatitis</b>	96	72 (75%)	63 (66%)	89 (46,4%)	103 (53,6%)
<b>Controles</b>	217	156 (71,9%)	169 (77,9%)	230 (53%)	204 (47%)

EHA: Enfermedad hepática alcohólica. Alcohólicos frente a controles ( $P = 0,076$ ). Alcohólicos con EHA frente a alcohólicos sin EHA ( $P = 0,661$ ). Alcohólicos con cirrosis frente a hepatitis alcohólica ( $P = 0,609$ ).

## 5. ESTUDIO FUNCIONAL DE LOS POLIMORFISMOS rs35996865 de *ROCK1* y rs2230774, rs978906 de *ROCK2*

El estudio funcional de los polimorfismos *ROCK1* (rs35996865) y *ROCK2* (rs2230774 y rs978906) en relación con la expresión de ARNm de dichas quinasas según sus diferentes genotipos arrojó los siguientes resultados.

### 5.1 Análisis de la muestra global

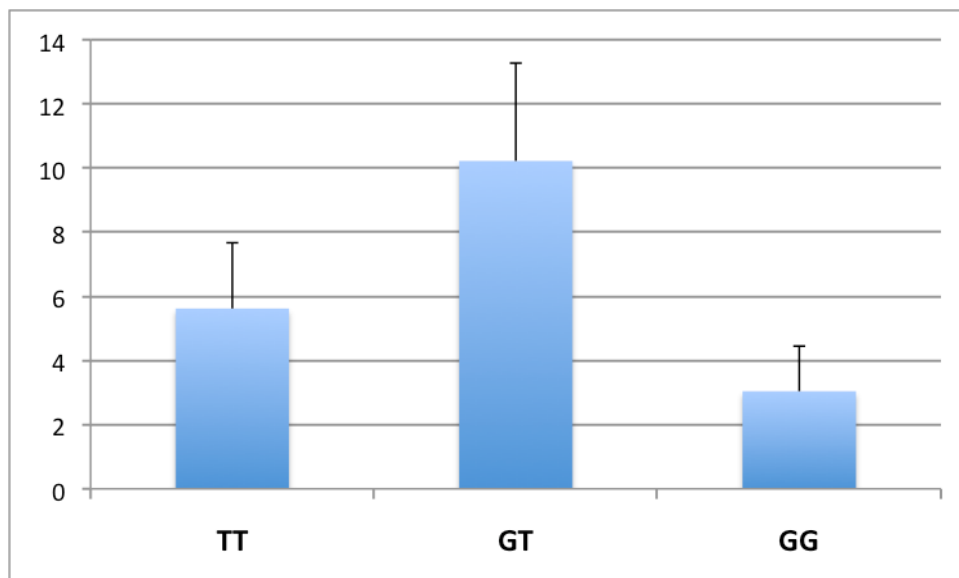
Los resultados del análisis de la muestra global (incluyendo casos y controles) se muestran en la tabla 20, que refleja la relación entre la expresión de las rho-quinasas en función de los distintos genotipos de los tres polimorfismos analizados.

**Tabla 20. Expresión relativa de ARNm de *ROCK1* y *ROCK2* en función de los diferentes genotipos de los polimorfismos *ROCK1* (rs35996865) y *ROCK2* (rs2230774 y rs978906) y respectivamente, en la muestra global.**

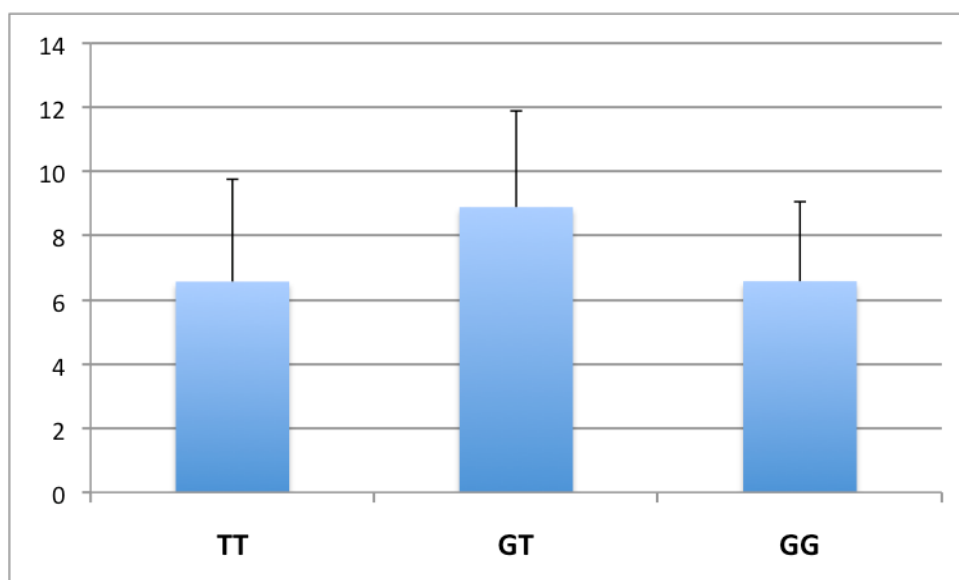
Polimorfismo	N	Expresión relativa (media y DE)	P-valor (ANOVA)
<i>ROCK1</i> (rs35996865)			0,355
TT	20	5,62 (2,05)	
GT	25	10,22 (3,05)	
GG	4	3,04 (1,41)	
<i>ROCK2</i> (rs2230774)			0,820
TT	11	6,57 (3,19)	
GT	25	8,89 (3,01)	
GG	13	6,58 (2,48)	
<i>ROCK2</i> (rs978906)			0,762
TT	14	6,53 (2,29)	
CT	24	9,02 (3,13)	
CC	11	6,57 (3,19)	

DE (desviación estándar)

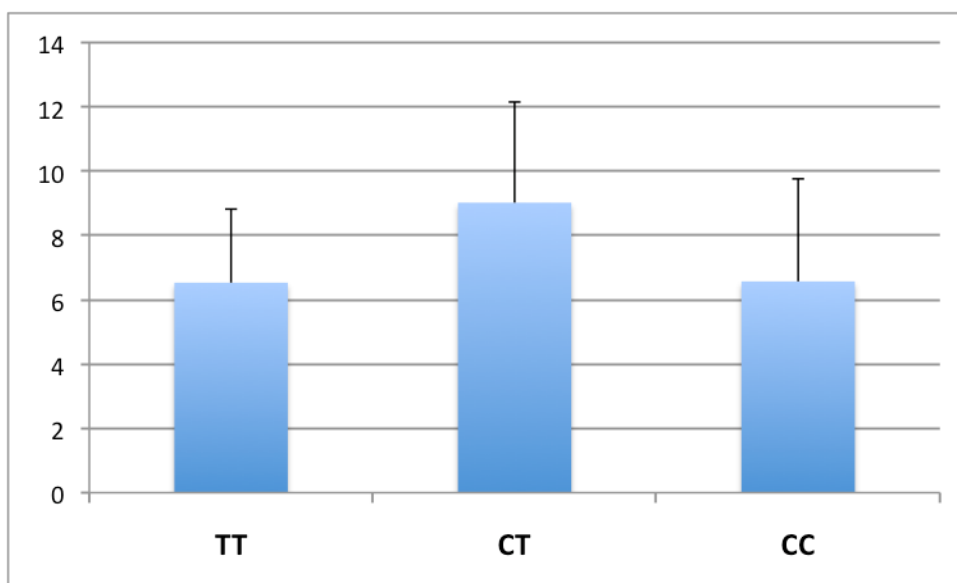
Como se observa en la tabla 20 y en las figuras 38-40, no se encontraron resultados estadísticamente significativos en el análisis global de la muestra entre los diferentes genotipos de los tres polimorfismos estudiados.



**Figura 38.** Expresión relativa del ARNm de ROCK1 en función de los genotipos en el polimorfismo *ROCK1* (rs35996865).

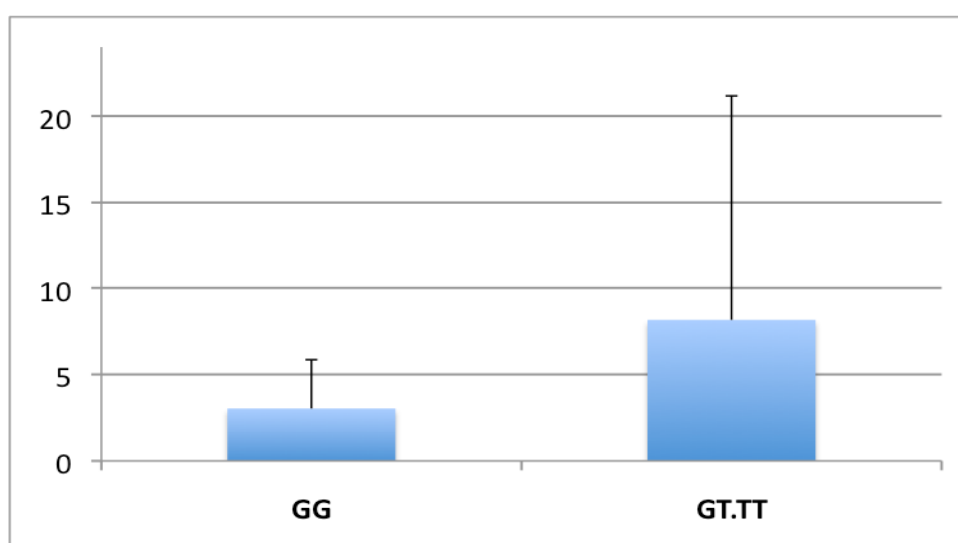


**Figura 39.** Expresión relativa del ARNm de ROCK2 en función de los genotipos en el polimorfismo *ROCK2* (rs2230774).



**Figura 40.** Expresión relativa del ARNm de *ROCK2* en función de los genotipos en el polimorfismo *ROCK2* (rs978906).

Sin embargo, al analizar las diferencias entre los genotipos del polimorfismo *ROCK1* (rs35996865), sí encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,045$ ) al agrupar los portadores del alelo T (GT + TT) y compararlos con aquellos portadores del genotipo GG. De esta forma, los portadores del alelo T (genotipos GT y TT combinados) tendrían una expresión relativa media de *ROCK1* de 8,18 (SD 12,99 ) mayor que los portadores del genotipo GG (expresión media de 3,04 [SD 2,83]).



**Figura 41.** Expresión relativa del ARNm de *ROCK1* en función de la presencia alélica del polimorfismo *ROCK1* (rs35996865) en la muestra global. Se observan diferencias significativas ( $P = 0,045$ ) entre la expresión en portadores del genotipo GG frente a los portadores del alelo T (genotipos GT+TT).

## 5.2 Análisis de los casos

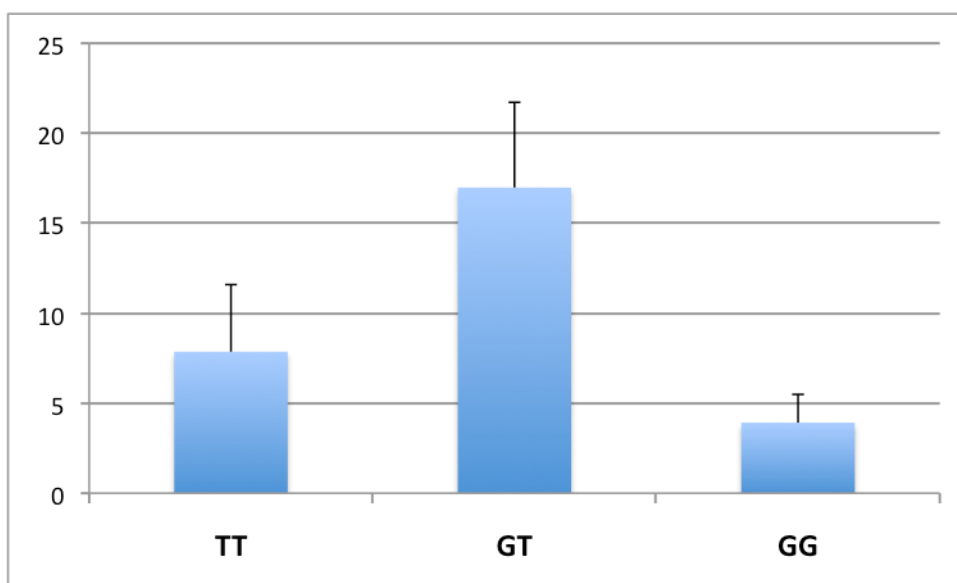
En la tabla 21 se muestran los resultados del análisis de la expresión del ARNm de las Rho-quinasas en función del genotipo en los casos con intoxicación alcohólica.

**Tabla 21. Expresión relativa de ARNm de ROCK1 y ROCK2 en función de los diferentes genotipos los diferentes genotipos de los polimorfismos *ROCK1* (rs35996865) y *ROCK2* (rs2230774 y rs978906) y respectivamente, en la muestra agrupada por casos.**

Polimorfismo	N	Expresión relativa (media y DE)	P-valor (ANOVA)
<i>ROCK1</i> (rs35996865)			0,223
TT	10	7,86 (3,73)	
GT	14	16,98 (4,74)	
GG	3	3,92 (1,57)	
<i>ROCK2</i> (rs2230774)			0,827
TT	6	11,24 (5,26)	
GT	13	14,03 (5,32)	
GG	8	9,79 (3,62)	
<i>ROCK2</i> (rs978906)			0,734
TT	9	9,34 (3,23)	
CT	12	14,71 (5,74)	
CC	6	11,25 (5,26)	

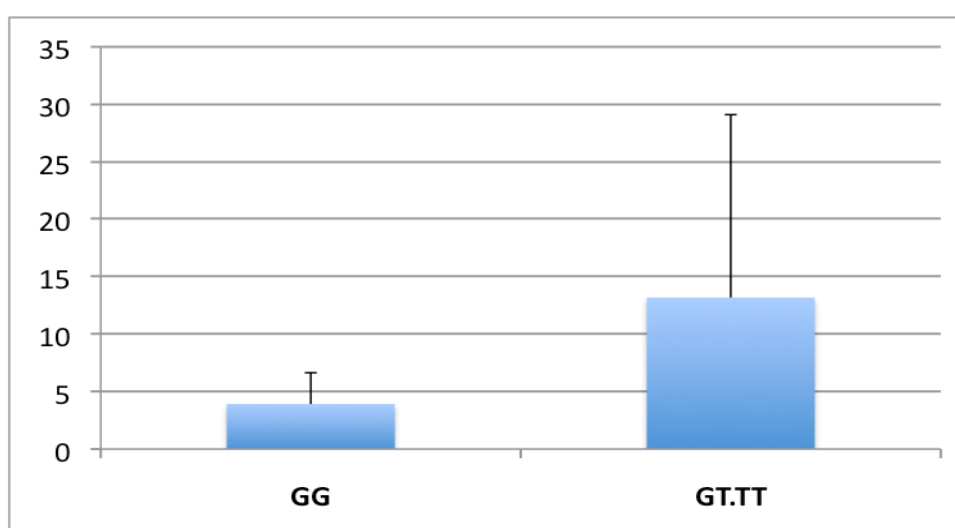
DE (desviación estándar)

No se encontraron resultados estadísticamente significativos en el análisis de los casos de la muestra global entre los diferentes genotipos de los tres polimorfismos estudiados.



**Figura 42. Expresión relativa de los genotipos en el polimorfismo ROCK1 (rs35996865) limitado a los casos de la muestra global.**

Dentro del estudio de los casos con intoxicación alcohólica, analizando las diferencias entre los genotipos del polimorfismo *ROCK1* (rs35996865), encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,018$ ) al agrupar los portadores del alelo T (GT + TT) y compararlos con aquellos portadores del genotipo GG. De esta manera, los portadores del alelo T (genotipos GT y TT combinados) tendrían una expresión media de 13,18 (SD 15,92 ) frente a una expresión de 3,92 (SD 2,72 ) en aquellos portadores del genotipo GG.



**Figura 43. Expresión relativa del ARNm de ROCK1 en función de la presencia alélica del polimorfismo ROCK1 (rs35996865) en los casos.** Se observan diferencias significativas ( $P = 0,018$ ) del genotipo GG frente a los portadores del alelo T (genotipos GT+TT).

### 5.3 Análisis de los controles

Los resultados obtenidos del análisis de los controles dentro de la muestra global se detallan en la tabla 22. La relación entre la expresión de las rho-quinasas y la presencia de los distintos genotipos de los tres polimorfismo analizados se ha expresado mediante la media aritmética y la desviación típica.

**Tabla 22. Expresión relativa de los diferentes genotipos de los polimorfismos *ROCK1* (rs35996865) y *ROCK2* (rs2230774 y rs978906), controles.**

Polimorfismo	N	Expresión relativa (media y DE)	P-valor (ANOVA)
<i>ROCK1</i> (rs35996865)			0,526
TT	10	3,38 (1,68)	
GT	11	1,62 (0,59)	
GG	1	0,41	
<i>ROCK2</i> (rs2230774)			0,474
TT	5	0,95 (0,46)	
GT	12	3,33 (1,44)	
GG	5	1,46 (0,58)	
<i>ROCK2</i> (rs978906)			0,443
TT	5	1,45 (0,58)	
CT	12	3,33 (1,44)	
CC	5	0,95 (0,46)	

DE (desviación estándar)

No se encontraron resultados estadísticamente significativos en el análisis de los controles de la muestra global entre los diferentes genotipos de los tres polimorfismos estudiados.



## 4. DISCUSIÓN

Este trabajo presenta un análisis amplio, en modelos *in vivo* y con modelos celulares *in vitro*, del efecto del etanol sobre la activación de las rho-quinasas. Es importante reseñar en primer lugar por tanto, que el hecho de analizar los efectos del etanol sobre el sistema inmune tanto en sangre periférica de pacientes como en estudios *in vitro* conlleva sus diferencias y complejidades, tanto a nivel metodológico como a la hora de la interpretación de los hallazgos realizados. Los estudios *in vivo* permiten un análisis global de la compleja interacción entre las células del sistema inmunitario y los diferentes reguladores de la homeostasis fisiológica del cuerpo humano. Por otro lado, el diseño del estudio *in vitro*, nos ha permitido el análisis específico del efecto de la intoxicación etílica con importantes cantidades de alcohol en células como los astrocitos, el cual no se podría haber realizado de otra manera, teniendo en cuenta las consideración éticas y técnicas.

## **1. EXPRESIÓN DE RHO-QUINASAS EN VIVO DURANTE EL EPISODIO DE INTOXICACIÓN AGUDA O CONSUMO INTENSIVO DE ALCOHOL**

### **A) CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS**

#### **Selección de casos y controles *in vivo*.**

Nuestro trabajo se ha diseñado como un estudio transversal del tipo casos y controles. En este tipo de estudios, se intenta determinar si existe una asociación entre una determinada enfermedad y una serie de variables potencialmente relacionadas sin que el investigador ejerza ninguna influencia en el proceso, limitándose a ser un mero observador.<sup>150</sup>

En el caso de este trabajo, nuestro objetivo ha sido por un lado, el de analizar la expresión de los ARNm de las rho-quinasas en sus isoformas ROCK1 y ROCK2 en sangre periférica de personas que consumen alcohol en elevada cantidad en una única ocasión (*binge drinking* o consumo intensivo de alcohol) respecto a controles, así como correlacionar esta expresión de las rho-quinasas con la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF-alfa e IL-8, IL1-beta) y TLR. Por otro lado, y ya en modelos celulares *in vitro*, investigar su expresión tras la exposición a etanol tanto en células mononucleadas de sangre periférica como en astrocitos de ratón. Por último, hemos analizado la distribución de tres polimorfismos (rs35996865 [T>G] del gen *ROCK1*, rs2230774 [G>T] y rs978906 [T>C] del gen *ROCK2* en pacientes alcohólicos con cirrosis hepática, pacientes alcohólicos sin hepatopatía y controles sanos.

Para el diseño de un estudio de casos y controles se requiere la selección de dos grupos de individuos, diferenciándose aquellos en los que se presenta la enfermedad (casos) y aquellos en los que no (controles, en nuestro caso, en ausencia de intoxicación alcohólica aguda). De esta manera pueden estudiarse las diferencias en determinadas variables en ambos grupos. Sin embargo, este diseño no está exento de sesgos. Los sesgos más importantes y comunes serían los realizados durante la selección de los casos y de los controles, así como la presencia de variables o factores de confusión. En nuestro estudio, un punto potencialmente posible de sesgo sería el patrón de consumo de alcohol previo a la inclusión de nuestro trabajo, sobre todo, teniendo en cuenta que la respuesta inflamatoria asociada al consumo intensivo de alcohol podría ser diferente en sujetos que se someten a episodios de *binge drinking* repetidos frente aquellos que presentaran estos episodios de forma esporádica o bien en el caso de que se tratara de su primer episodio.

En este aspecto, existen estudios con datos obtenidos en modelos animales en la expresión de otros genes que sí que parecen indicar una variación en dicha expresión ante los episodios repetidos *binge drinking*.<sup>151</sup> Este dato podría explicar, como discutiremos más adelante, los diferentes resultados obtenidos en función del género.

Respecto a la selección de los controles, estos deben ser lo más parecidos en sus características a los casos. Es por ello que deben escogerse sujetos con una distribución similar en edad, sexo, raza... y cualquier otra variable que se considere potencialmente relacionada con la variable objeto de estudio. De esta manera, conseguimos una menor presencia de posibles factores de confusión así como un aumento de la eficiencia estadística.<sup>152-153</sup> En nuestro trabajo, aunque los grupos de

estudio fueron representativos respecto a la edad y sexo de la población en riesgo para intoxicación etílica aguda, hay diferencias en estas variables debido a que la inclusión de controles resultó más complicada de lo previsto ante la dificultad de encontrar sujetos de la edad objetivo sin episodios de consumo intensivo de alcohol. Para resolverlo, inicialmente se planificó un diseño de casos autocontrolados, en el que cada sujeto serviría como su propio control en situación de abstinencia de consumo de alcohol, pero la colaboración en este aspecto no fue la deseada (en buena medida por el elevado número de participantes que no tenían su lugar de residencia habitual en la provincia de Salamanca) y no pudo completarse el diseño de esta manera.

Es por ello, que se decidió la selección del grupo control con criterios estrictos de no consumo de alcohol habitual o previo. Para ello, se recurrió a la participación de voluntarios sanos, principalmente estudiantes de las ramas sanitarias tanto de Medicina como de Enfermería en periodo de formación, que se encontraran rotando en los servicios de Urgencias o Medicina Interna del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Por este motivo y debido a las dificultades arriba expuestas, la edad de los controles fue ligeramente superior a la de los casos (media de edad 20 años en los casos respecto a una media de 23 de los controles). Sin embargo, no consideramos que se hayan alterado de manera significativas los resultados de nuestro trabajo debido a la diferencia mínima existente así como los resultados obtenidos en la estratificación por edades.

Para evitar la posible presencia de otros sesgos de confusión se emplearon criterios de inclusión y exclusión estrictos. De esta manera, se definieron como criterios de exclusión de los casos aquellos pacientes con consumo previo de otra droga exceptuando la nicotina. Esto incluyó el consumo de anfetaminas, heroína, cocaína, cannabis, drogas de diseño o benzodiacepinas, descartando su consumo a través de la ausencia de signos de uso de dichas sustancias de abuso y de un análisis toxicológico realizado en la orina. Además, en el momento de otorgar el consentimiento para la inclusión del estudio, se excluía a los pacientes que reconocieran el consumo de estas sustancias.

Si bien en la primera muestra de estudio no se encontraron diferencias en la distribución del sexo de casos y controles, en la muestra utilizada para el análisis de los polimorfismos genéticos en pacientes con consumo excesivo de alcohol y/o hepatopatía alcohólica, encontramos que la muestra se compuso en su totalidad por varones, lo cual supone por un lado la posibilidad de controlar directamente este posible factor de confusión en el análisis genético pero a la vez una limitación importante para la generalización de los resultados en esta parte de nuestro trabajo.

Para finalizar, comentar que un posible sesgo de nuestro estudio consistiría en considerar el consumo de tabaco como un factor de confusión. Si bien algunos trabajos indican que los sujetos fumadores pueden presentar un aumento de los niveles de citoquinas inflamatorias circulantes,<sup>154-155</sup> otros autores no han conseguido demostrar esta asociación.<sup>156</sup>

## **Consideraciones metodológicas de los estudios de expresión relativa del ARNm de *ROCK1* y *ROCK2* en sangre periférica**

El análisis del ARNm en sangre periférica nos permite visualizar una imagen global de la respuesta del sistema inmune ante un consumo agudo e intenso de alcohol, sin embargo, no nos permite valorar la respuesta específica de diferentes tipos celulares. Debe tenerse en cuenta que debido a la naturaleza de la recogida de este tipo de muestras (habitualmente en el servicio de Urgencias hospitalarias, en horario nocturno y durante fines de semana en la mayoría de los casos), no ha sido posible realizar con detalle determinados estudios funcionales o procesar las muestras para recoger los diferentes tipos celulares. Para complementar esta parte del estudio y subsanar, en parte, esta limitación, se ha realizado un análisis posterior en modelos celulares de exposición a etanol *in vitro*.

### **Obtención y procesamiento de las muestras**

La adecuada obtención de las muestras así como la purificación de su ARN son, junto con la correcta selección de los sujetos participantes en el estudio, uno de los pasos más importantes desde el punto de vista metodológico. Este paso es determinante ya que va a determinar la reproducibilidad y consistencia de los resultados posteriores de la PCR. Es por esto que es fundamental cuantificar y evaluar con precisión la calidad del ARN extraído antes de realizar la transcripción reversa.<sup>157</sup>

Tal y como se ha detallado anteriormente, se ha llevado un meticuloso proceso en el procesamiento de las muestras hasta obtener el ARN. De igual manera, se ha hecho especial hincapié en un correcto almacenamiento de las mismas para evitar degradación del ARN o la contaminación por microorganismos. Como se ha descrito, la cuantía del ARN obtenido así como su pureza se determinaron mediante un

espectrofotómetro, utilizado el cociente DO260 / DO280 para determinar el grado de contaminación, considerándose como aceptables aquellos valores comprendidos entre 1,6 y 2,0.

Por otro lado, se debe tener en cuenta la diferencia horaria en la obtención de las muestras de casos (como se ha comentado, en horario nocturno principalmente), y los controles, ya que en estos últimos la recogida se realizó sobre todo por la mañana. Diferentes estudios han descrito variaciones circadianas en la secreción de las citoquinas inflamatorias, con diferencias inter-individuales, lo cual puede ser una limitación en los resultados a tener en cuenta en nuestro trabajo.<sup>158-159</sup>

### **Optimización de la PCR**

Para examinar los cambios de expresión de uno o más genes de interés a partir del ARN, la técnica más usada de manera global en la PCR. Esto se debe principalmente a su sensibilidad y especificidad unido a su sencillez y bajo coste. Por todo ello, ofrece una amplia ventajas sobre otros métodos como la PCR semi-cuantitativa o el *Northern blot*, habiéndose convertido en la herramienta más usada para la cuantificación absoluta y relativa de los niveles de ARNm.<sup>160</sup> Para garantizar las máximas condiciones de precisión arriba referidas, el protocolo de PCR utilizado en nuestro trabajo se llevó a cabo mediante un control de calidad metodológico siguiendo las recomendaciones de las guías MIQE (del ingles, *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*).<sup>161</sup> De esta manera y entre otras medidas, se incluyó un control negativo en cada fila de la placa que contenía todos los componentes de la reacción, a excepción del ADNc retrotranscriptivo. Además, todas las muestras se realizaron por duplicado, repitiendo todas aquellas cuya desviación estándar entre duplicados fuera mayor a 1. Se efectuó

también una curva de fusión para cada uno de los genes utilizados, de tal manera que sirviera como verificación de la ausencia de dímeros de *primers*. Por último, se llevó a cabo un test de Grubbs previo al análisis de los resultados, para comprobar la ausencia de valores extremos o *outliers*.<sup>162-163</sup>

### **Selección del gen de referencia**

Para el estudio de los cambios relativos en la expresión génica de ARNm en diferentes tejidos o condiciones experimentales, la PCR es el método de elección. Sin embargo, pueden existir diferentes errores secundarios a la extracción de las muestras, la calidad del ARN y la síntesis del ADNc. La normalización con genes de referencia permite, en parte, disminuir estos posibles errores. Para el análisis de la expresión génica del ARNm es necesaria la elección de un gen de referencia adecuado para cada tejido, muestra o condición experimental, de tal manera que se pueda garantizar la exactitud de los resultados de un experimento.<sup>164</sup> En este aspecto, se han realizado diferentes estudios y existen en la literatura científica numerosos trabajos que muestran cómo el uso de genes de referencia inadecuados puede llevar a conclusiones erróneas, en forma de falsos positivos o negativos.<sup>165-166</sup>

Por otro lado, la normalización frente a un único gen de referencia no es metodológicamente aceptable a no ser que la invariabilidad de su expresión se demuestre bajo las condiciones del diseño experimental.<sup>167</sup> Es por ello que en nuestro trabajo hemos realizado un análisis y posterior validación del gen de referencia en las condiciones de nuestro estudio, es decir, hemos medido la expresión del gen en las muestras sanguíneas de los pacientes *in vivo* con consumo intensivo de alcohol y en los controles.



Para encontrar el gen de referencia más adecuado, nos hemos basado en los trabajos realizados con anterioridad en nuestro laboratorio,<sup>163,168</sup> utilizando la actina como gen de referencia. Este gen ya había sido analizado y validado previamente en nuestro laboratorio mediante los algoritmos BestKeeper, GeNorm, y NormFinder.<sup>169-170</sup> Por otro lado, el gen de la actina ha sido descrito también previamente en otros trabajos.<sup>171-172</sup> Si bien existen publicaciones que postulan que su expresión puede verse modificada por la presencia de enfermedad hepática alcohólica,<sup>173</sup> no hemos encontrado, hasta el mejor de nuestro conocimiento, estudios experimentales que demuestren o sugieran que exista una alteración del mismo en sangre periférica por el consumo de alcohol.

Según la literatura revisada, nuestro estudio sería el primero en analizar la expresión del ARNm en sangre periférica de las rho-quinasas y las diferentes citoquinas inflamatorias empleando genes de referencia validados en las mismas muestras sanguíneas.

## **B) RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN DE LAS RHO-QUINASAS EN VIVO**

### **Expresión relativa del ARNm de *ROCK1* y *ROCK2* en sangre periférica**

Nuestro estudio ha conseguido demostrar una asociación entre el consumo intensivo de alcohol (*binge drinking*) y un incremento significativo en la expresión de las dos isoformas de ROCK en la sangre periférica de pacientes con este patrón de consumo respecto a los controles. Como resultados principales en esta parte de nuestro estudio, hemos encontrado que un aumento significativo de ambas isoformas de ROCK (casi 5 veces superior en el caso de ROCK1 y algo más de el triple en ROCK2) en la sangre periférica de pacientes con intoxicación etílica aguda ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,05$  respectivamente). Estos resultados también se han encontrado en el análisis posterior por subgrupos etarios, encontrando la significación estadística en pacientes de 27 años o de menor edad ( $P < 0,001$  y  $P < 0,05$ , respectivamente) así como en la subdivisión por géneros, siendo los resultados en mujeres significativos en ambas isoformas ( $P < 0,001$  para ROCK1 y  $P < 0,05$  para ROCK2) respecto a los hombres en los que no se alcanzó la significación estadística.

Por tanto, existe un aumento significativo de la expresión tanto de la ROCK1 como de la ROCK2, estableciéndose dicha relación con mayor potencia tanto en jóvenes de 27 años o menor edad así como en el sexo femenino, pudiendo en estos casos encontrar una significación estadísticamente significativa.

Este resultado viene a confirmar nuestra hipótesis de que un consumo intensivo de alcohol puede alterar la expresión de las rho-quinasas, jugando un papel importante dentro de la inflamación inducida por el consumo alcohol, que a su vez participa en la lesión de diferentes órganos como el cerebro o el hígado. Como ya se ha comentado previamente, una posible explicación a este hecho, sería en primer lugar el aumento de la permeabilidad intestinal provocado tanto por el efecto tóxico directo del alcohol como del acetaldehído producido en su metabolización, provocando tanto del aumento de los niveles sanguíneos de lipopolisacárido (LPS) como de ADN bacteriano.<sup>42-44</sup> Este hecho, haría aumentar la expresión del ARNm de las rho-quinasas, mediante una activación rho-dependiente, con la consiguiente la activación de la vía del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y las diferentes citoquinas como el TNF- $\alpha$  sintetizado a partir de la activación de esta vía, mediante un mecanismo de retroalimentación positiva.<sup>85,174-176</sup>

Por otro lado, la lesión hepática subsiguiente al daño hepático directo o indirecto sufrido por este consumo intensivo de alcohol, también aumentaría la expresión de dichas proteínas a través de una activación rho-independiente a través de las caspasas en el contexto de la apoptosis o muerte celular del hepatocito.

En nuestro estudio, hemos identificado que este aumento de expresión ocurre en el conjunto global de las muestras y, al hacer subgrupos, solo hemos obtenido una significación estadística en el sexo femenino y en individuos con una edad de 27 años o inferior. Aunque la pérdida de significación al dividir la muestra puede deberse únicamente a la disminución de potencia estadística, dado que continúa observándose un incremento no significativo, también hay que tener en cuenta la mayor susceptibilidad del género femenino a la toxicidad por el consumo de alcohol, con una

mayor dificultad para su metabolización. En diferentes trabajos, se han encontrado unas tasas mayores de alcoholemia así como unos efectos deletéreos mayores en mujeres que en varones a pesar del consumo de la misma cantidad de alcohol.<sup>177-179</sup>

Entre las potenciales causas de estas diferencias se encontrarían la acción estrogénica, la cual condiciona una mayor respuesta inmune tanto celular y humoral, así como un posible efecto inmunomodulador del cromosoma X, el cual codifica varias proteínas cuya función está íntimamente ligadas al sistema inmune, tales como los TLR o *toll like receptors* como diferentes receptores de citoquinas (IL2RG e IL13RA2, por ejemplo).<sup>180-183</sup>

Con respecto a los resultados encontrados en función del grupo etario, destacar que una posible explicación para este hecho sería la diferente sensibilidad de los sujetos jóvenes a los estímulos inflamatorios frente a los más mayores. Esto puede ser debido a que la población más joven posee una mayor capacidad de activación macrocitaria, de expresión de TLR4 y de producción de interleucinas.<sup>184</sup> Por otro lado, el efecto que el alcohol ejerce sobre la inmunidad es dosis dependiente, y con la edad se produce una metabolización más lenta del alcohol, lo cual de manera conjunta hace que la memoria inmunológica y su respuesta sea menor.<sup>58</sup>

Se debe tener en cuenta además, que en los sujetos más jóvenes existe una mayor sensibilidad a la ingesta de alcohol. Esta última parte puede explicarse gracias a estudios que han demostrado el efecto negativo que el consumo de alcohol provoca a nivel neuronal tanto en modelos animales como en humanos, afectando sobre todo de manera negativa a la plasticidad neuronal de los más jóvenes y provocando un

deterioro en el desarrollo y la funcionalidad cerebrales así como en el desempeño neuro-psicológico.<sup>185-186</sup>

Por último, no podemos descartar la existencia de otros estímulos que hayan sido inducidos por este consumo intensivo de alcohol así como diferentes factores ambientales o epigenéticos que influyan de alguna manera este aumento de expresión de las rho-quinasas. Por ejemplo, la ingesta de alcohol puede reducir la presencia de vasodilatadores como el óxido nítrico (uno de los factores que explican la hipertensión inducida por alcohol), mediador que a su vez es capaz de inhibir las rho-quinasas, por lo que la ingesta de alcohol puede incrementar su expresión por esta vía e independientemente de la activación de las vías inflamatorias del TLR.<sup>187-189</sup>

### **C) CORRELACIÓN CON CITOQUINAS INFLAMATORIAS**

La última parte de este apartado de nuestro estudio ocupa los resultados obtenidos en relación a los niveles de rho-quinasas respecto a los niveles de etanol, TLR y citoquinas inflamatorias.

Respecto a la primera correlación, hemos encontrado una correlación positiva ( $r=0,273$ ;  $P=0,032$ ) entre los niveles de etanol en sangre y la expresión de ROCK1. Estos hallazgos se limitan a la isoforma ROCK1 y a la muestra global, si bien al realizar el análisis sin un valor *outlier* estos resultados se confirman aún con mayor fuerza, estableciéndose una correlación positiva ( $r=0,358$ ;  $P=0,005$ ). Sin embargo, al analizar únicamente los casos, esta relación se invierte ( $r=-0,167$ ;  $P=0,340$ ), si bien estos resultados no alcanzan la significación estadística al eliminar el valor *outlier*. Del análisis de los gráficos (figuras 22 y 23), de los resultados de la

comparación entre casos y controles y de la ausencia de significación tras retirar el valor *outlier* parece evidente que la correlación significativa entre niveles de etanol y niveles de ROCK1 encontrado en casos no presenta relevancia y que la correlación positiva en el conjunto de la muestra total traduce la diferencia entre casos y controles. Aunque resulta plausible biológicamente, sobre todo al haber diferencia entre casos y controles, que una mayor concentración de etanol se asocie con niveles mayores de ROCK1, resulta también muy difícil encontrar una correlación debido a los diferentes momentos temporales de toma de la muestra en relación con la ingesta y las potenciales diferencias en la cantidad de alcohol consumida para un mismo nivel de etanol en sangre, además de diferencias en variables como el sexo o la edad (que para un mismo nivel de etanol pueden implicar un diferente grado de activación de estas quinasas).

En el caso de la isoforma ROCK2, hallamos dicha correlación negativa moderada y estadísticamente significativa ( $r = -0,412$ ;  $P = 0,013$ ) en la muestra global, pero dicha significación se pierde con la exclusión del valor *outlier*. En el análisis de los casos, no se encontraron resultados significativos en ninguno de los dos análisis (con y sin *outlier*).

Como hemos comentado previamente, el consumo de alcohol va a provocar un aumento de la permeabilidad intestinal, permitiendo un aumento de la concentración sanguínea del LPS y del ADN bacteriano.<sup>42-44</sup> Esto genera una respuesta inflamatoria indirecta y directa por el propio efecto tóxico del alcohol sobre las células de Kupffer, otras células del sistema inmune y de los órganos diana del efecto tóxico del alcohol, que genera una activación de la vía inflamatoria del NF- $\kappa$ B, con un aumento de la secreción de citoquinas y TNF- $\alpha$ . Como hemos explicado, las rho-quinasas juegan un papel intermediario en la activación de esta vía<sup>103-105</sup> siendo activadas además tanto de manera dependiente por estos estímulos como de manera independiente por la apoptosis de otras células como los hepatocitos y la fagocitosis de los restos celulares así como de las enzimas tipo caspasa y granzimas.<sup>80</sup> Este aumento de la permeabilidad intestinal también se puede ver influido a su vez por este aumento de la expresión de las rho-quinasas, dado que se ha comprobado la correlación positiva entre su expresión y esta alteración así como se ha podido demostrar que la inhibición de las mismas disminuye dicha permeabilidad si bien no de manera completa.<sup>189-190</sup> Estos hallazgos, aunque han sido realizados en modelos *in vitro*, sugieren que para este aumento de la permeabilidad vascular intestinal mediada por el alcohol, son necesarias en parte, la expresión de estas proteínas, si bien y dada la no completa reversión de este proceso, parece indicar que existen otras vías y mecanismos para esta alteración de la barrera intestinal.

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo vendrían a reforzar la hipótesis de nuestro estudio así como estos hallazgos previos. Encontramos una mayor expresión de las rho-quinasas, en especial de la isoforma ROCK1, cuya presencia se ve principalmente en las células del sistema inmune, muy abundantes en la barrera

epitelial intestinal. Por tanto y como hipótesis, esta correlación positiva entre la ROCK1 y la alcoholemia, podría venir a reflejar cómo el etanol por un lado, y una retroalimentación positiva por parte de las rho-quinasas, favorecen la alteración de la barrera intestinal con un mayor aumento del paso a la sangre del LPS y otros restos bacterianos como su ADN. La mayor presencia de la isoforma ROCK2 en miocardiocitos y células de la musculatura vascular, pueden explicar la ausencia de resultados positivos de dicha isoforma en esta parte de nuestro estudio.

Respecto al análisis de los niveles de la expresión de TLR a través de la medición de su ARNm, hemos observado una correlación positiva estadísticamente significativa, entre la expresión relativa de ROCK1 y los niveles de TLR-4 tanto para el conjunto de la muestra global ( $r = 0,486$ ,  $P = 0,001$ ) como para el análisis restringido solo a los casos ( $r = 0,423$ ,  $P = 0,044$ ). No se encontraron resultados significativos en los referentes a la relación de ROCK1 y los TLR1 y TLR2. En el caso de ROCK2, encontramos resultados significativos con una correlación también positiva ( $r = 0,466$ ,  $P = 0,024$ ) entre esta isoforma y la expresión de TLR4.

En todos los casos anteriormente descritos, la significación se pierde al repetir el análisis sin el valor *outlier* salvo la correlación TLR4-ROCK1 en la muestra global.

Respecto a ROCK2, encontramos una significación positiva en ambos escenarios ( $r = 0,493$ ,  $P = 0,001$  y  $r = 0,466$ ,  $P = 0,024$  respectivamente para muestra global y casos), perdiendo a su vez la significación tras el análisis sin el valor *outlier* salvo en la muestra global ( $r = 0,324$ ,  $P = 0,036$ ).



Como hemos comentado previamente, el aumento de la permeabilidad intestinal provocado por el consumo de alcohol así como el propio aumento de expresión de las rho-quinasas, facilita el paso del LPS a la circulación portal. Este aumento de los niveles de LPS activará a las células del sistema monocito-macrófago induciendo la secreción de citoquinas inflamatorias.<sup>32,191</sup> Esta activación se lleva a cabo a través del TLR4 principalmente,<sup>192</sup> por lo que estos resultados son consistentes con una elevación del TLR con el consumo intensivo de alcohol, y la consecuente elevación de rho-quinasas influyendo en un aumento de expresión de los niveles del ARNm de la TLR4. No podemos descartar tampoco que el aumento de TLR4 y de ROCK1 se produzca por mecanismos parcialmente independientes, pero en ambos casos traduce esa activación del sistema inmune por el consumo de alcohol.

Gubbels et al.<sup>184</sup>, contemplan además cómo en la población joven (establecida en un corte de edad entre los 20 y 45 años) la expresión de TLR4 se encuentra aumentada, incluso con mayor fuerza en la población femenina que en la masculina, por lo que durante el consumo de alcohol, esta activación macrocitaria podría ocurrir con una mayor potencia.

El papel del TLR4 en la activación de la inflamación hepática y de otros órganos inducida por consumo de alcohol ha sido demostrada en estudios previos. No solamente un aumento de la expresión de este receptor provoca un aumento del estímulo inflamatorio a nivel hepatocitario, sino que además se ha visto implicado en la resistencia a la insulina y a una mayor probabilidad de desarrollar esteatosis hepática en modelos murinos. Por otro lado, la inhibición de este receptor ha demostrado ejercer un efecto protector sobre la posibilidad de desarrollar tanto esteatosis grasa no alcohólica como hepatopatía producida por el alcohol.<sup>193-195</sup>

Nuestros resultados, provenientes además de estudios *in vivo*, apoyan los anteriores trabajos realizados en estudios murinos y posteriormente en humanos, ya que, ante un consumo intensivo de alcohol, especialmente en población joven, se provoca un aumento concomitante de la expresión del ARNm de los TLR4, favoreciendo la activación inflamatoria a través de células del sistema monocito-macrófago como las células Kupffer, la activación de las rho-quinasas y la síntesis del NF-kappaB. Para comprobar esta hipótesis, sería necesario realizar estudios *in vitro* comprobando que la inhibición de las rho-quinasas resulta en una menor activación de estas vías, lo que se plantea como una futura línea de investigación.

Resulta también de interés, de forma independiente, el incremento de la expresión de TLR4 en casos frente a controles. Estudios previos como el de Bala et al,<sup>196</sup> demostraron la asociación de la ingesta de etanol en voluntarios sanos y el aumento del LPS circulante, lo que induciría un aumento de la expresión de los TLR4. Si bien existen estudios cuyos resultados no muestran esta asociación,<sup>197</sup> existieron diferencias metodológicas importantes (como fue el uso de niveles de etanol menores) que impiden definir con claridad dichos resultados contradictorios. Trabajos posteriores,<sup>53,198</sup> sí que han vuelto a corroborar cómo el consumo intensivo de alcohol en voluntarios sanos aumenta los niveles tanto de LPS como la expresión de TLR4. Así, Afshar et al<sup>53</sup> determinaron los niveles de citoquinas en diferentes momentos (a los 20 minutos, 2 y 5 horas) tras un consumo intensivo de alcohol. Tras esto, observaron un aumento temprano de los niveles de monocitos con una mayor sensibilidad al LPS así como un aumento de la producción de TNF- $\alpha$ . Sin embargo, en las dos siguientes mediciones, y coincidiendo con una bajada de los niveles de etanol en sangre estos niveles disminuyeron de manera concomitante así como la

capacidad de inducción por el LPS. Por otro lado, un estudio reciente del grupo español de Orio et al<sup>198</sup>, ha demostrado la existencia de unos mayores niveles de endotoxina y la activación de los receptores TLR4 y la vía inflamatoria del NF-kappaB en jóvenes de 20 años con consumo intensivo de alcohol de al menos dos años de duración. Estos niveles estaban relacionados con los niveles de etanol en sangre y se corroboró su disminución según pasaba el momento de la última ingesta de alcohol. Además, comprobaron un mayor aumento de dichas citoquinas y una mayor actividad inflamatoria en mujeres que en varones. Este último estudio, no solo presenta una metodología similar a nuestro trabajo sino que sus resultados vienen a dar más fuerza a nuestros hallazgos.

Las diferencias encontradas entre sexos, se ha visto reflejada también en otros estudios. Por ejemplo, en el caso de Engler et al,<sup>199</sup> se manifestó cómo tras la inyección de LPS en voluntarios sanos por debajo de los 30 años, los niveles de citoquinas inflamatorias como la IL-6 y el TNF- $\alpha$  en mujeres aumentaban respecto a varones. Con esto, demostraron una respuesta inflamatoria más profunda en el caso de mujeres que en hombres. Sin embargo, estas diferencias no tuvieron una alteración clínica clara, lo que lleva a pensar en la existencia de mecanismos compensatorios para contrarrestar este aumento de la respuesta inflamatoria en las mujeres, que resulta difícil de determinar por el diseño observacional de nuestro trabajo.

Por último, comentar que en el caso del daño hepático inducido por el alcohol, el papel del receptor TLR4 no está aclarado del todo. Existen resultados contradictorios en estudios murinos en los que la pérdida o inhibición de las células de Kupffer reduce el daño hepático mediante la disminución de la inflamación y la necrosis hepática.<sup>200-202</sup> En el caso contrario, existen trabajos que indican que esta inactivación no supondría una disminución de la lesión hepática pero sí de la esteatosis inducida

por el alcohol.<sup>203</sup> Una posible explicación sería la existencia de otros mecanismos lesivos todavía no aclarados, si bien existe evidencia suficiente que apunta al gran papel del TLR4 en la activación del sistema inflamatorio tras la ingesta de alcohol que lleva al daño hepatocitario concretamente.

Para terminar, hemos encontrado una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre la expresión relativa de ROCK1 y los niveles de IL1- $\beta$  e IL-8 en el análisis exclusivo de los casos ( $r = 0,423$ ,  $P = 0,044$ ) y ( $r = 0,483$ ,  $P = 0,023$ ) respectivamente, tratándose en ambos casos de una correlación positiva. En el caso de la ROCK2 y la IL1- $\beta$ , en el análisis de los casos también muestra una correlación positiva ( $r = 0,466$ ,  $P = 0,025$ ). En los casos descritos anteriormente, la significación se pierde al repetir el análisis sin el valor *outlier*. Por último, no encontramos ningún tipo de significación respecto a los niveles de TNF- $\alpha$ .

Estos resultados parecen afianzar la hipótesis en la que ante un consumo intensivo de alcohol, se produce un incremento en la permeabilidad intestinal, el aumento del LPS en la sangre, un aumento de la expresión del TLR4 y con ello la activación del sistema monocito-macrófago (mediado en parte por la activación de las rho-quinasas), cuya consecuencia es un aumento de la producción de las citoquinas inflamatorias.

En el estudio llevado a cabo por el grupo español de Pascual et al,<sup>179</sup> se reclutaron a pacientes adolescentes y jóvenes con intoxicación alcohólica aguda definida como el consumo de al menos 50 gramos de alcohol en los varones y 40 g de alcohol en las mujeres en las 6 horas anteriores. En los análisis realizados descubrieron un aumento significativo de las IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10 así como del IFN- $\gamma$  y la IL-17A, principalmente en mujeres. Posteriormente, replicaron esta situación con modelos murinos, encontrando asimismo un aumento de las citoquinas IL-1 $\beta$  e IL-

17A. A su vez, descubrieron un aumento de la activación del TLR4 sobre todo en hembras así como la consiguiente fosforilación del NF-kappaB. Como en estudios murinos previos, la delección del TLR4 no se vio acompañada de dicha elevación de citoquinas y células pro-inflamatorias, demostrando la importancia del TLR4 en la activación la vía inflamatoria responsable de la neuroinflamación inducida por el consumo de alcohol.

Por otro lado, en el trabajo llevado a cabo por Fujimoto et al,<sup>204</sup> sobre la intoxicación alcohólica aguda en pacientes con enfermedad hepática establecida, descubrieron unos mayores niveles del LPS así como de IL-6 e IL-8 en los pacientes con enfermedad hepática previa frente a controles, relacionándose además unos niveles mayores como un factor de peor pronóstico para la supervivencia global en pacientes con enfermedad hepática avanzada. A su vez, tanto la IL-6 como la IL-8 mostraron una correlación positiva respecto a los niveles de neutrófilos y en el caso de la IL-6, también con el aumento de la PCR. Llamativamente, en ninguno de los casos se encontraron niveles importantes del TNF- $\alpha$ , al igual que en nuestro trabajo.

Este último resultado llama la atención dado el papel que representa el TNF- $\alpha$  en la activación del NF-kappaB y en la hepatopatía alcohólica, desde el momento que el aumento de sus concentraciones producen lesión y muerte celular.<sup>40-41,54-56</sup> Establecer una hipótesis clara para explicar la no detección de niveles significativos de TNF- $\alpha$  es difícil y hace pensar en la existencia de mecanismos de auto-regulación que no se conocen con exactitud. La combinación de los efectos directos de la intoxicación aguda de alcohol así como el aumento de los niveles de LPS de manera indirecta, activan, varias vías de inflamación pero también pueden ser capaces de desarrollar diferentes mecanismo anti-inflamatorios que pudieran explicar este hecho.

Como hemos explicado previamente, existe una dificultad añadida al comparar los estudios *in vitro* con los estudios en modelos humanos, ya que los primeros no pueden abarcar todos los factores implicados en la complejidad de los segundos.

Por lo anteriormente descrito, puede verse cómo la regulación de la expresión del TNF- $\alpha$  es compleja, interaccionando varias vías pro-inflamatorias que llevan a la secreción de diferentes citoquinas como la IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 a través de un aumento de la expresión del TLR4 y la activación del NF-kappaB, mientras que por otro lado, un consumo intensivo de alcohol puede poner en marcha otros mecanismos anti-inflamatorios como la inhibición del TNF-  $\alpha$ , que equilibren los mecanismos anteriores.

Trabajos previos han demostrado cómo la exposición aguda de monocitos humanos a etanol *in vitro* provocaba un aumento de la proteína hsp70, inhibiendo la expresión del NF- $\kappa$ B, y dando lugar a una disminución de la producción del TNF- $\alpha$ .<sup>205</sup> Al realizar dicho experimento, pero exponiendo a los macrófagos a diferentes dosis de etanol durante más tiempo, aumentaba la producción de proteínas como la hsp90, provocando el efecto inverso. Esto refleja cómo la expresión del TNF-  $\alpha$  a nivel transcripcional puede verse influida por la exposición al etanol. Existen diferentes estudios *in vitro* en los que se relaciona el consumo intensivo de alcohol con la disminución de los valores de TNF- $\alpha$  en la sangre periférica. Esto se explica dado que concentraciones elevadas de etanol pueden inhibir a la enzima TACE (del inglés, *tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme*), la cual es la encargada de liberar el TNF- $\alpha$  al plasma sanguíneo, pero sin afectar a la producción de citoquinas como la IL-8.<sup>206-208</sup>

Estos hallazgos vendrían a confirmar la hipótesis de la existencia de una relación entre el consumo intensivo de alcohol, con un aumento de la expresión de las rho-quinasas como una de las vías para la activación del NF-kappaB y con el consecuente aumento de las citoquinas inflamatorias así como de la expresión del TLR4 y una disminución de la producción del TNF-  $\alpha$ .

## **2. EXPRESIÓN *IN VITRO* DE RHO-QUINASAS TRAS LA EXPOSICIÓN A ETANOL**

### **A) CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS**

Como hemos comentado previamente, la siguiente parte de nuestro trabajo consistió en medir la expresión de las rho-quinasas tras la exposición a etanol en modelos *in vitro*, tanto en células mononucleadas de modelos humanos como se ha descrito con anterioridad, como en astrocitos de modelos murinos.

Ya se ha discutido sobre el papel del aumento de la permeabilidad intestinal en el mayor paso del LPS a la sangre y cómo éste, a través del TLR4 principalmente, activa al sistema monocito-macrofágo.<sup>32-33</sup> Este sistema, no solo incluye a las células de Kupffer hepáticas sino a los monocitos de la sangre periférica y la astrogliá cerebral.<sup>78,110,209-210</sup> Sin embargo, encontramos de nuevo la dificultad de extrapolar resultados entre lo que puede ocurrir en los astrocitos humanos y en los de ratón, volviendo a la posible discrepancia entre los modelos *in vivo* e *in vitro*.

En lo referente a modelos humanos, parece encontrarse, al igual que en los modelos animales, que el consumo intensivo de alcohol produce una alteración a largo plazo de las funciones neurocognitivas así como alteraciones en la morfología cerebral.<sup>71,211-212</sup> Incluso existen estudios que discriminan estos cambios, así como la producción de citoquinas inflamatorias nivel cerebral, en función del sexo,<sup>179,213</sup> si bien otros estudios no han conseguido encontrar dichas diferencias.<sup>214</sup> Existen otros trabajos que si bien no apuntan directamente a la función astrocitaria, sí que afirman cómo el consumo crónico de alcohol, y sobre todo en adolescentes, provoca un enlentecimiento de las funciones cerebrales con una disrupción neuronal en la corteza prefrontal y diferentes zonas cerebelosas.<sup>186</sup>



Por otro lado, Jones et al<sup>215</sup> efectuaron una extensa revisión sobre los cambios que se producen en los cerebros de los sujetos adolescentes con consumo intensivo de alcohol. Se insiste en la pérdida de materia gris sobre todo a nivel prefrontal, temporal y cerebeloso como supuesto efecto neurotóxico del alcohol así como una pérdida mayor con un consumo continuado durante el tiempo. Por otro lado, el consumo intensivo de alcohol durante la adolescencia ha demostrado, con resultados contradictorios, una reducción en el desarrollo de la materia blanca cerebral. Por último, este tipo de sujetos presentan una respuesta menor a la hora de la toma de decisiones así como una respuesta más lenta y de menor intensidad en lo que respecta al circuito de recompensa.

De manera concomitante a los cambios descritos anteriormente en el tejido cerebral y, más concretamente, en el plano de los astrocitos, el etanol provoca cambios en la densidad de los mismos, siendo estos cambios dependientes al tiempo de exposición al tóxico y reversibles tras el cese de dichos comportamientos. La inflamación que provoca el consumo intensivo de alcohol así como la producción de citoquinas, provoca daño neuronal e inflamación glial. Los astrocitos y la microglía, a diferencia de las neuronas, son mediadores en la inmunidad innata, expresando receptores TLR.<sup>77</sup> Las diferentes señales inflamatorias provocadas por el consumo de alcohol, ya sea de manera directa o indirecta a través de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de las células gliales como la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , así como la sobre-expresión aparente de los TLR en respuesta al consumo crónico de alcohol, parecen jugar un papel clave en la degeneración neuronal.

Floreani et al,<sup>72</sup> en modelos humanos, demostraron cómo la activación de la COX-2 producida en los astrocitos por el etanol, aumentaba la secreción de citoquinas inflamatorias a través de un aumento de la expresión de los TLR4, tras una incubación con 20 mM de etanol durante 48 horas, si bien alargaron dicha incubación hasta las 168 horas y aumentaron la concentración del etanol hasta los 100 mM para demostrar su viabilidad. Aunque no midieron la actividad de las rho-quinasas, su estudio potencia la viabilidad de los astrocitos a las concentraciones usadas en nuestro estudio así como el papel fundamental de los mismos en la neuroinflamación. En lo que respecta a los aspectos metodológicos utilizados en los estudios de PCR, se aplican las consideraciones apuntadas en el apartado anterior.

A efectos metodológicos, es muy difícil establecer una relación entre estos modelos humanos y murinos dado que muchos de estos estudios *in vivo* son estudios transversales por lo que los hallazgos observados podrían no corroborarse posteriormente en otros diseños que traten de establecer causalidad o con otras condiciones experimentales. Sin embargo, parece claro que el consumo intensivo de alcohol produce una inflamación a nivel cerebral que provoca una serie de cambios estructurales y neurocognitivos, sino que en el centro de dicha neuroinflamación, se encontrarían los astrocitos y las células gliales.<sup>216</sup>

## **B) RESULTADOS EN CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGRE PERIFÉRICA**

Respecto al análisis de la expresión de las rho-quinasas en las células mononucleadas de sangre periférica, utilizamos las condiciones *in vitro* de control, etanol a concentración de 50 mM, LPS a concentración de 100 ng/μl y etanol 50 mM más LPS 100 ng/μl. En todas las condiciones los resultados se midieron a las 6 horas (en la última condición, se añadió el LPS de la quinta a la sexta hora de incubación). Nuestros hallazgos más relevantes fueron el aumento de expresión de la ROCK1 en las tres condiciones según la siguiente intensidad de mayor a menor: Etanol + LPS > Etanol > LPS. En el primer caso, los niveles de ROCK1 medidos superaban hasta en 10 veces a los controles, frente a 6 y 4 veces en las otras dos condiciones.

Como se ha comentado previamente, el efecto citotóxico directo derivado del metabolismo del alcohol puede provocar la muerte celular, como se ha comprobado con los hepatocitos. Esta muerte celular en este caso se produce, a través de los restos celulares liberados, la activación de neutrófilos y macrófagos. Por otro lado, la apoptosis del hepatocito a través de la activación de las caspasas también provocará la inflamación hepática a través de las células mononucleadas estimuladas por las vías del interferón y el NF-κB, en la cual juega un papel fundamental la activación de las rho-quinasas si bien no es la única vía de dicha activación.<sup>35</sup>

El trabajo nombrado con anterioridad llevado a cabo por Zhao et al,<sup>190</sup> utilizando células intestinales procedentes de la línea celular del adenocarcinoma de colon Caco-2 en humanos, encontraron que la activación del NF-κB a través de la vía de las rho-quinasas, estaría íntimamente ligada a la disrupción de la barrera intestinal mediada

por el consumo de etanol. Para ello, incubaron las células con etanol a una concentración del 5% (v/v) (equivalente a 85mM aproximadamente) durante 1 h y midieron la actividad de ambas isoformas de ROCK tanto a nivel de ARNm por PCR como mediante *western blotting*. Sus resultados mostraron cómo la exposición a etanol de estas células epiteliales intestinales provocaban un aumento de hasta 4 veces en los valores de ROCK1 y ROCK2 respecto a los controles. Esta diferencia en lo que respecta los resultados positivos para la isoforma ROCK2 puede deberse principalmente al uso de otro tipo celular diferente al realizado en nuestro trabajo. Por otro lado, su estudio no encontró diferencias estadísticamente significativas en los niveles de NF- $\kappa$ B totales pero sí que encontraron un aumento de la expresión del NF- $\kappa$ B en los núcleos celulares de las células tratadas con etanol. Esto último podría ser debido al corto periodo de incubación al que se vieron sometidas las células del grupo de etanol.

Al igual que en nuestro estudio, la exposición a etanol supone un aumento de la expresión de las rho-quinasas, si bien en nuestra investigación no llegamos a encontrar resultados reproducibles respecto a la isoforma ROCK2 a pesar de utilizar diferentes muestras. Respecto a la isoforma ROCK1, sí que encontramos resultados superponibles al anterior estudio, si bien con una expresión aún mayor (de hasta 6 veces respecto a los controles), y sobre todo en la condición que combinaba etanol y LPS (casi hasta 11 veces superior), lo cual lleva a reafirmar el papel del etanol, el LPS y la activación de la señalización de la vía de las ROCK tanto en esta alteración de la barrera intestinal como en el aumento de la transcripción del NF- $\kappa$ B .

Para terminar, destacar el estudio de Tong et al,<sup>189</sup> en el que ya previamente habían demostrado cómo el uso de la molécula Y-27632, inhibidora de la actividad de las rho-quinasas, inducía el efecto contrario al estudio anterior. Para ello, utilizando el mismo grupo celular y las siguientes condiciones: Etanol (5%) durante 0 minutos, etanol (5%) durante 15 minutos, etanol (5%) durante 30 minutos, etanol (5%) durante 60 minutos, y etanol (5%) durante 0 minutos más la molécula inhibitoria Y-27632 (en esta última condición las células Caco-2 fueron tratadas con anterioridad con 10  $\mu$ M de dicha molécula durante otros 60 minutos). Con estas condiciones, comprobaron cómo el uso de la molécula inhibitoria provocaba una disminución de la disrupción de la barrera epitelial inducida por el etanol, lo que apunta una vez más a la relación de dicho hecho con la vía de las rho-quinasas. Sin embargo, esta disminución fue solo parcial, lo que como hemos comentado previamente, plantea que quizás existan otras vías secundarias interviniendo en dicho proceso.

### **C) RESULTADOS EN ASTROCITOS DE RATÓN EXPUESTOS A ETANOL**

En nuestro estudio, utilizamos astrocitos de ratón en cuatro condiciones, midiendo las cuatro a las 24 horas [control, etanol a concentración de 50 mM, LPS a concentración de 100 ng/μl, etanol 50 mM y LPS 100 ng/μl (durante 24 horas y 1 hora, respectivamente)]. Entre los hallazgos principales que hallamos al realizar el análisis de la expresión de las rho-quinasas, destacar un aumento de la expresión de la isoforma ROCK1 en los astrocitos incubados con el etanol, estadísticamente significativa ( $P=0,032$ ). Este aumento de expresión se ha cuantificado hasta casi 4 veces con mayor potencia que en los controles y el resto de condiciones. No encontramos diferencias significativas entre los controles y el resto de condiciones, tampoco en la condición que empleaba conjuntamente el etanol y el LPS.

Como hemos comentado previamente, Blanco et al,<sup>74</sup> fueron de los primeros investigadores en demostrar en modelos murinos el papel del NF-κB en la neuro-degeneración ligada al consumo de alcohol. Sus trabajos han mostrado cómo existe un aumento de expresión del NF-κB en astrocitos tratados con etanol, y con ellos el aumento de la COX-2 y la iNOS. Si bien en nuestro trabajo utilizamos unas concentraciones de etanol de 50 mM durante 24 horas, en su estudio, usando concentraciones de 100 mM con mediciones a los 15, 30 y 60 minutos, así como a las 24 y 72 horas, encontraron niveles significativos de iNOS y de COX-2 a los 15 minutos, siendo el pico máximo tanto a los 30 minutos como a las 24 horas, siendo esta última medición la utilizada en nuestro estudio, ya que la inducción máxima de estas proteínas se ha visto correlacionada con la activación del NF-κB.

Más adelante, trabajos llevados a cabo por Suk et al,<sup>75</sup> demostraron cómo la activación de los astrocitos mediante el LPS y otras citoquinas inducían su apoptosis, así como la producción de NO, el cual precedía la muerte celular astrocitaria. Para ello, usaron combinaciones variables de LPS (concentración de 100 ng/ml), TNF- $\alpha$  (concentración de 100 ng/ml) e IFN- $\gamma$  (concentración de 100 U/ml) durante 48 horas. Al igual que en nuestro estudio, no encontraron diferencias significativas en la activación astrocitaria en el cultivo de astrocitos con LPS por sí mismo, aunque sí encontraron un aumento de la expresión del NO producido en las siguientes combinaciones y de mayor a menor intensidad: LPS + IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  > IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  > LPS + IFN- $\gamma$  > LPS + TNF- $\alpha$ . En ninguna de las condiciones utilizaron etanol como único estimulante o combinado como en nuestro caso con el LPS, pero sí que se puede observar, el efecto sinérgico que tienen las diferentes citoquinas inflamatorias que median en la neuroinflamación y la apoptosis astrocitaria.

Guasch et al,<sup>112</sup> demostraron con su trabajo cómo la intoxicación con etanol induce la activación de las rho-quinasas a nivel cerebral, con aumento principalmente de la isoforma ROCK1, al igual que en nuestro trabajo, produciendo la activación de la vía inflamatoria a través de la activación del TLR4 y un aumento de los niveles de NF- $\kappa$ B. A diferencia de nuestro estudio, y con tan solo concentraciones de etanol de 10 mM durante 10 y 30 minutos, encontraron la máxima expresión de las mismas en esta última medición, con hallazgos similares a los obtenidos por Blanco et al,<sup>74</sup> si bien en su caso la expresión máxima también se encontró a las 24 horas, medición que no se llevó a cabo en el estudio de Guasch et al.<sup>112</sup>

En el caso de Miñambres et al,<sup>110</sup> investigaron la apoptosis astrocitaria a través del cultivo de astrocitos con 100 y 200 mM de etanol, realizando mediciones a las 3, 6, 14 y 24 horas. Encontraron, a ambas concentraciones, y a partir de las 3 horas, un aumento progresivo de la población apoptótica. En sus estudios a 24 horas, no solo descubrieron que el tratamiento con etanol a concentraciones de 100 mM provocaba un aumento concomitante de los niveles de ROCK1, sino que además esta activación se produciría de manera directa y no indirectamente a través de las caspasas. Dichos hallazgos refuerzan nuestros resultados en los que la incubación a las mismas concentraciones y durante el mismo periodo, provocaría un aumento de los niveles de ROCK1 hasta 4 veces superiores respecto a los controles, si bien en su caso, no utilizaron la condición de la combinación entre LPS y etanol. Comentar también que en este mismo trabajo, hallaron actividad de la ROCK1 a partir 6 horas del tratamiento con etanol, alcanzando su punto máximo a las 14 horas y volviendo a los valores iniciales a las 24 horas, en contraposición a lo descritos en otros trabajos y en nuestro propio estudio.

Para terminar, se debe tener en cuenta la dificultad añadida que presenta el hecho de comparar estudios realizados con astrocitos de modelos murinos, con los astrocitos de modelos humanos, si bien parece comprobarse cómo el etanol es un activador directo de la neuroinflamación y la activación glial.



### **3. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE GENES CANDIDATOS**

#### **A) CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS EN EL ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LAS RHO-QUINASAS Y LA PRESENCIA DE ENFERMEDAD ASOCIADA AL CONSUMO DE ALCOHOL**

Al realizar estudios sobre la asociación de determinados genes candidatos y diferentes enfermedades, existen características especiales en la metodología aplicada que pueden afectar a los resultados obtenidos.<sup>217-218</sup> No es infrecuente encontrar en ocasiones resultados contradictorios para una misma relación de causalidad entre un polimorfismo y una enfermedad. Estas diferencias entre estudios podrían explicarse por la existencia de una diversidad real en la carga genética de las distintas poblaciones. Sin embargo, esta falta de reproducibilidad de los resultados puede ser también debida a problemas de validez interna de los estudios genéticos de casos y controles, principalmente por sesgos específicos y posibles factores de confusión, que complican la interpretación de los resultados de este tipo de trabajos.<sup>219-222</sup> Entre los potenciales problemas que determinan esta dificultad pueden darse, entre otros, que las características basales de los grupos de casos y controles sean diferentes o bien que difieran en los factores de exposición a la enfermedad.

##### **Presencia de factores de confusión**

Cuando una determinada variable se asocia de manera independiente y simultánea tanto con la enfermedad como con el factor de riesgo analizado, hablamos de la presencia de un factor de confusión.<sup>223-224</sup> En nuestro trabajo, existen diferentes factores que han podido ejercer una influencia tanto para el desarrollo de EHA (sexo, patrón de consumo...) como para la adicción a sustancias (abuso de alcohol, de otras

drogas de abuso o policonsumos, patología psiquiátrica previa...<sup>177, 225</sup> En el caso de la edad, el riesgo de desarrollar EHA aumenta con el paso del tiempo y el consumo acumulado. En nuestro caso, encontramos una diferencia importante entre la edad media de los dos grupos estudiados (alcohólicos con y sin EHA). Dado que no hemos encontrado relaciones significativas, no se ha realizado ningún tipo de ajuste estadístico. En el caso de haber encontrado alguna asociación estadísticamente significativa, y tal y como se describe en la metodología, se hubiera realizado el ajuste mediante un modelo multivariable. Por último, una variable que puede favorecer el desarrollo de la lesión hepática, y no que no ha sido recogida en nuestro trabajo, es la obesidad,<sup>226</sup> la cual ha podido jugar un papel como factor de confusión.

### **Estratificación poblacional**

El sesgo de la estratificación poblacional se produce, por ejemplo, cuando se analiza una población formada por varios grupos étnicos diferentes, lo que determina que la población estudiada esté compuesta por varias subpoblaciones, con influencia de diferentes factores ambientales y diferentes genes. En estos casos es posible que la frecuencia alélica del polimorfismo analizado sea diferente, así como el riesgo de desarrollar la enfermedad.<sup>218-223</sup>

Para controlar este sesgo, en nuestro trabajo se ha intentado homogeneizar la población de estudio, de tal manera que todos los individuos eran de raza caucásica. Por otro lado, se ha cumplido el equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los polimorfismos analizados, lo que demuestra que se cumplen los estándares y condiciones de este principio para nuestra muestra poblacional (ausencia de mutaciones o selección genética, ausencia de migraciones o interacciones genéticas, etc.). Sin embargo, caber recordar que la ausencia de este sesgo incluso en poblaciones

aisladas no siempre se cumple, por lo que no es posible garantizar por completo su control.<sup>223-224</sup>

### **Clasificación correcta de casos y controles**

Como hemos comentado previamente, la correcta clasificación de la muestra poblacional en la que se etiqueten como casos a los sujetos que poseen la enfermedad y como controles a aquellos que no la tienen es básica para una correcta elaboración de este tipo de estudios. En nuestro trabajo, además, hacemos una subclasificación dentro de los pacientes con alcoholismo, por un lado si sufren o no una EHA y por otro lado si son abusadores o dependientes del alcohol. Para el reclutamiento de los casos, se contó con la posibilidad de realizarlo a través de una unidad médica especializada en patología relacionada con el alcohol. Estos pacientes se remitían desde Atención Primaria o cualquier otro servicio en el que se hubiera detectado un consumo perjudicial de alcohol. Si bien es cierto que no existe un criterio claro y definido sobre la cantidad de alcohol a partir de la cual su consumo resulta perjudicial, en este tipo de pacientes, el consumo medio fue mayor al de los valores utilizados de manera habitual.<sup>227</sup> Respecto a la clasificación de los casos como paciente alcohólicos abusadores o dependientes, se utilizaron las definiciones utilizadas en el momento de la inclusión del estudio según los criterios del manual DSM-IV.

Por último, la prueba diagnóstica fundamental para el diagnóstico de la EHA sería la biopsia hepática. Sin embargo, y por razones éticas, resultaría difícil plantear esta prueba a todos los casos del estudio, teniendo en cuenta además que se trata de una prueba invasiva no exenta de complicaciones.<sup>228</sup> Por esta razón, en la inclusión de controles en nuestro trabajo utilizamos la normalidad clínica, analítica y ecográfica

como criterio de inclusión en dicho grupo de controles con consumo de alcohol similar al de los pacientes con cirrosis hepática. Este esquema ha sido utilizado previamente en otros estudios,<sup>229-230</sup> además de cumplir con lo especificado en las guías clínicas, las cuales recomiendan realizar una biopsia hepática solamente en aquellos casos de sospecha de hepatopatía grave secundaria al consumo de alcohol, en los que el resultado de la biopsia cambiaría la actitud terapéutica a seguir o bien en aquellos casos en los que se plantea un ensayo clínico con el objetivo de desarrollar nuevos tratamientos.<sup>227</sup> Por otro lado, existen numerosos estudios que muestran la buena correlación entre los procedimientos y marcadores realizados de manera no invasiva frente los hallazgos histopatológicos en la biopsia hepática. Como principal limitación en nuestro trabajo destaca que no se realizó elastografía, actualmente considerada como la técnica estándar para la valoración de forma no invasiva la presencia de daño hepático, principalmente dado que los casos y controles se recogieron durante un periodo prolongado de tiempo y muchos de ellos antes de que esta técnica estuviera accesible.<sup>231-235</sup>

En lo que respecta a la asociación de las variantes genéticas analizadas con el desarrollo o ausencia de alcoholismo sí que se han reclutado a pacientes sanos como controles siendo en esta parte del estudio todos los casos alcohólicos. Además, estos controles sanos son necesarios para verificar que se cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg, ya que cualquier patología presente, incluido el consumo excesivo de alcohol, pueden alterar el mismo.

## **Obtención y procesamiento de las muestras**

Una correcta obtención y procesamiento posterior de la muestra es imprescindible para obtener unos resultados precisos y válidos. Incluso manteniendo este tipo de precauciones, se calcula que el porcentaje de error en los estudios de genotipado se sitúa entre el 1 y el 3%.<sup>236-237</sup> En nuestro trabajo, y según se ha detallado en el apartado de material y métodos, hemos aplicado un estricto protocolo de procesamiento de las muestras de sangre periférica hasta obtener el ADN, con el fin de evitar la alteración o contaminación de las muestras. Por otro lado, y en relación al proceso de genotipado, para evitar errores se realizó un control de la calidad metodológica mediante la aplicación de normas ya protocolizadas en trabajos previos,<sup>238-239</sup> como fueron la duplicación de las muestras en diferentes placas, la utilización de pocillos vacíos de control así como la confirmación de la coherencia de los resultados mediante el cotejo de resultados de diferentes placas entre sí.

Igualmente, y para tratar de minimizar los posibles sesgos, utilizamos placas mixtas con muestras tanto de casos como de controles en cada análisis. Además, repetimos el genotipado de todas aquellas muestras que no alcanzasen un grado de discriminación satisfactorio en el primer análisis.<sup>224</sup> Se comprobó el cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los polimorfismos que estudiamos, así como se verificó la similitud de las frecuencias alélicas que obtuvimos de los controles con las descritas en poblaciones similares en estudios previos. Todo ello con el objetivo de confirmar la correcta determinación del genotipo de los individuos incluidos en nuestro trabajo.<sup>240</sup>

Por último, destacar que a lo largo de nuestro proceso de genotipado un porcentaje inferior al 5% de pocillos de control fueron contaminados, porcentaje de muestras similar al que fue necesario la repetición del genotipado.<sup>224</sup> Es por esto, que creemos que se puede considerar que nuestro trabajo cumple de manera razonada la ausencia de sesgos de genotipado, al menos en un porcentaje que pudiera alterar la validez de nuestros resultados de manera significativa.<sup>241</sup>

### **Asociación funcional polimorfismo-enfermedad en la hepatopatía alcohólica**

A la hora de aceptar la existencia de una relación causal entre un polimorfismo y una determinada patología, una de las condiciones a comprobar es que cumpla la plausibilidad biológica. De esta manera, es necesario que el polimorfismo estudiado provoque una alteración de la proteína codificada por el gen en cuestión y que esa proteína esté implicada en patogenia de la enfermedad.<sup>217,219</sup> Sin embargo, el hecho de conocer con exactitud el papel de una determinada proteína en una enfermedad no es fácil.

Como ocurre en nuestro trabajo, la ausencia aparente de relación entre un determinado polimorfismo y una enfermedad tras un resultado estadísticamente no significativo puede ser debido a un resultado real (verdadero negativo), o bien ser un resultado falso negativo como consecuencia de un sesgo o una baja potencia estadística. El verdadero negativo, o ausencia de relación genotipo-fenotipo, puede ser consecuencia de una falta de relevancia funcional del polimorfismo estudiado o bien que la proteína en cuestión sí que esté involucrada en la patogenia de la enfermedad, pero quizás de una manera no lo suficientemente importante para que modifique de manera significativa el riesgo de desarrollarla. Tampoco se conocen habitualmente las

diferentes interacciones que pueden darse entre genes o incluso la influencia de los diferentes factores epigenéticos que pueden alterar la expresión y regulación de los mismos.<sup>242-243</sup> En cualquiera de los casos, la no asociación entre una variante genética específica y una patología, no implica la inexistencia de dicha asociación entre el gen y la enfermedad estudiada, dado que cada gen puede presentar varios polimorfismos diferentes.

La implicación de diferentes proteínas en la patogenia de la enfermedad hepática alcohólica se ha demostrado en numerosos estudios a partir de datos experimentales. Sin embargo, aún se desconocen muchos de los mecanismos causales de esta enfermedad así como la relación exacta de estas proteínas con el alcance de la enfermedad. Esto hace que la interpretación funcional de cualquier estudio genético de asociación se dificulte por la existencia habitual de datos contradictorios que impiden conocer la funcionalidad de los polimorfismos con exactitud. Estas diferencias se explican en parte por los diferentes métodos utilizados para valorar el efecto de las variantes genéticas así como las posibles discrepancias entre los resultados encontrados en estudio *in vitro* y la funcionalidad real de estos polimorfismos en el paciente real.<sup>244</sup> No existen, hasta el mejor de nuestro conocimiento, estudios previos que analicen de manera específica la funcionalidad de nuestros polimorfismos en pacientes con hepatopatía alcohólica o consumo previo de alcohol.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

No se ha establecido un criterio unificado sobre el modelo ideal para el análisis estadístico de los estudios basados en la asociación genética. De manera habitual, estos análisis se basan inicialmente en relacionar de manera directa una determinada variante con el desarrollo de una enfermedad, lo que impide tener en cuenta otros factores extrínsecos, la implicación de otros factores genéticos o la epigenética que puede estar implicada en este proceso.<sup>243,245</sup> Esta limitación se intenta solventar mediante distintas técnicas estadísticas que permiten valorar interacciones o factores de confusión. En lo referente a la investigación del potencial papel de las rho-quinasas en la respuesta inflamatoria ligada al daño hepático producido por el consumo de alcohol, ésta se encuentran aún en fases iniciales, lo que supone un problema añadido a la hora de plantear posibles interacciones.

### Ajuste del valor de $P$

La necesidad o no de utilizar un valor de  $P$  ajustado por comparaciones múltiples es otro de los puntos debatidos y a tener en cuenta en este tipo de estudios. En nuestro trabajo, no hemos realizado dicha corrección debido a que los polimorfismos estudiados están potencialmente asociados con la respuesta inflamatoria inducida por el alcohol, lo que aumenta la probabilidad *a priori* de su asociación con el alcoholismo o la EHA. De esta manera, y como se ha demostrado en estudios previos,<sup>246-247</sup> se reduce el riesgo de falsos negativos. Además, en nuestro caso, la plausibilidad biológica e integración de los diferentes resultados son los que nos darían la validez y plausibilidad de la asociación obtenida, todo ello dentro del enfoque bayesiano de un estudio exploratorio como el que presentamos en este trabajo.<sup>248</sup>



Por último, el uso combinado de las tablas 3x2 de genotipos y 2x2 de frecuencias y presencias alélicas reduce de manera importante el posible error tipo  $\beta$  del trabajo, aumentando por tanto su potencia sin un claro ascenso del error tipo  $\alpha$ .<sup>149</sup>

Para justificar esta plausibilidad biológica y como ya hemos explicado previamente *in extenso*, las rho-quinasas no solo se han descrito como proteínas con una implicación activa en la organización del citoesqueleto de las células, con gran importancia en la contracción celular y los mecanismos de apoptosis, sino que también su estudio posterior las ha asociado a diferentes enfermedades cardiovasculares, autoinmunes y procesos fisiológicos ligados a la inflamación.

Hasta el mejor de nuestro conocimiento, no se ha analizado hasta el momento la asociación entre los polimorfismos de las rho-quinasas de nuestro trabajo con trastornos inducidos por el consumo de alcohol. Es por ello que, tras una descripción de nuestros resultados, realizaremos un análisis de la implicación de dichos polimorfismos con otras patologías.

### **Polimorfismo rs35996865 del gen *ROCK1***

El análisis de distribución genotípica no mostró diferencias respecto a la distribución de los genotipos o los alelos al comparar los grupos de pacientes con alcoholismo y los controles ni entre los pacientes que desarrollaron una cirrosis hepática alcohólica o hepatitis alcohólica. Sin embargo, sí que encontramos diferencias, en el límite de la significación estadística ( $P = 0,05$ ), entre los pacientes con consumo excesivo de alcohol que desarrollaron EHA y los pacientes alcohólicos sin hepatopatía. Estas diferencias no se reprodujeron en el análisis de presencia alélica o de frecuencias alélicas.

Al analizar la posible relación entre los diferentes genotipos de este polimorfismo y la expresión de ROCK1, tal y como describimos en el apartado de resultados respecto a la muestra global, no encontramos ningún tipo de asociación entre los diferentes genotipos de este polimorfismo. Sin embargo, al agrupar los portadores del alelo T (GT + TT) y compararlos con aquellos portadores del genotipo GG, analizando sus diferencias, sí que conseguimos encontrar diferencias estadísticamente significativas. De esta manera, podemos afirmar que en nuestro trabajo, los portadores del alelo T (en el que combinamos los genotipos GT y TT ) tendrían una expresión casi tres veces superior de ROCK1 respecto a los portadores del genotipo GG (8,18 frente a 3,04). Al restringir el análisis a los casos, encontramos que los pacientes con intoxicación alcohólica presentan también diferencias significativas en la expresión del polimorfismo rs35996865 del gen *ROCK1* al agrupar los portadores del alelo T (GT + TT) frente a aquellos portadores del genotipo GG, con un aumento de la expresión hasta 4 veces mayor respectivamente (13,18 frente a 3,92). Este hecho refleja una potencial mayor expresión de esta enzima en paciente portadores de este alelo T, lo que podría suponer una mayor respuesta inflamatoria tras el consumo de alcohol y, como hipótesis, un riesgo mayor de desarrollar hepatopatía de origen alcohólico. En nuestra revisión de la literatura, no existen trabajos en este aspecto con los que comparar nuestros resultados. En el caso de los controles, no se encontraron resultados estadísticamente significativos al analizar la expresión de ROCK1 en los diferentes genotipos de este ni los otros dos polimorfismos estudiados.

Al no encontrar trabajos en la literatura con el mismo objetivo y, por tanto, con los que comparar directamente nuestros resultados, hemos revisado diferentes estudios para intentar relacionar nuestros hallazgos con la activación de la vía inflamatoria a otros niveles. Así, y como se ha comentado previamente, este polimorfismo de la isoforma ROCK1 ha sido estudiado por varios autores. Así hablamos cómo Pehlivan et al,<sup>128</sup> demostraron la asociación del alelo mayor (T) con el desarrollo de esclerosis sistémica a través de la activación de la vía de las rho-quinasas por la endotelina-1, lo que conllevaba una activación inflamatoria y precursora de fibrosis.

Por otro lado, Zhao et al<sup>131</sup> consiguieron relacionar la posesión del alelo G (genotipos GG y GT) de este polimorfismo con el desarrollo de cáncer renal de células claras y Liu et al,<sup>132</sup> asociaron la posesión del alelo T con un menor riesgo de recidiva del cáncer de próstata. El alelo T, en el caso del cáncer, sería protector en los estudios mencionados. En ambos casos la población para estudio fue de origen chino.

Otros estudios han seguido esta línea de asociación entre este polimorfismo y el desarrollo de cáncer aunque con resultados controvertidos. Sari et al,<sup>249</sup> encontraron una asociación positiva y significativa entre su posesión y el riesgo de desarrollo de cáncer colorrectal. Más concretamente, la posesión del alelo T (genotipos TT y TG) se asoció a dicho incremento del riesgo.

En el caso de Zucchini et al,<sup>250</sup> establecieron mediante un estudio de casos-contróles cómo la variación alélica G se encontró con mayor frecuencia en varones, estableciendo una posible asociación entre las variaciones genéticas polimórficas entre nuestro polimorfismo y el cáncer colorrectal (en concreto, con el genotipo GT).

En ambos estudios, como hemos explicado, este posible aumento del riesgo en la incidencia de tumoral se vería explicada por participación de las rho-quinasas en el proceso de la angiogénesis y la migración de las células tumorales.

Por último, en el caso de Oguz et al,<sup>130</sup> ya comentamos cómo consiguieron implicar a diferentes polimorfismos de las rho-quinasas con un mayor riesgo de padecer enfermedad de Beçhet, siguiendo el papel de la regulación de estas proteínas en la activación macrofágica y la síntesis del óxido nítrico endotelial, entre otros mecanismos. Si bien en el caso concreto del polimorfismo rs35996865, a diferencia de los resultados descritos por Pehlivan et al<sup>128</sup> en la esclerosis sistémica, no encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Como hemos descrito previamente, no existen en la literatura trabajos con los que comparar la relación del polimorfismo rs35996865 del gen *ROCK1* con la EHA o con otras alteraciones inducidas por alcohol, sin embargo, sí que parece (sobre todo los portadores del alelo T, al igual que en nuestro trabajo), que pueden asociarse con fenómenos inflamatorios como ocurre en la esclerosis sistémica e incluso en la enfermedad de Beçhet. En todo caso, en nuestro estudio este polimorfismo no alcanzó la significación estadística.

Sí que parece asociarse con más fuerza la posesión de este polimorfismo con el desarrollo de ciertos tipos de cáncer, aunque el alelo concreto asociado con el tumor depende de la población estudiada y del tipo de cáncer, siendo necesarios estudios de mayor tamaño para obtener mejores conclusiones. En todo caso, podemos plantear la hipótesis de que este polimorfismo tenga más importancia en las vías de angiogénesis y la migración de las células tumorales que influyen en el desarrollo del cáncer, sin poder descartar por completo su papel en la vía inflamatoria en diferentes niveles y

enfermedades.

Por último, otros estudios han relacionado la posesión del alelo T del polimorfismo rs35996865 del gen *ROCK1* con el riesgo de desarrollar síndrome metabólico (Tabur et al<sup>81</sup>) o con un mayor riesgo de desarrollar síndrome de distrés respiratorio en neonatos prematuros (Kaya et al<sup>129</sup>). Este último sí puede plantear una relación con nuestro trabajo en cuanto que el desarrollo de distrés respiratorio implica habitualmente una mayor inflamación pulmonar.

Como hemos comentado, en nuestro trabajo, y debido a la ausencia de estudios que hayan estudiado nuestro polimorfismo y la EHA, no podemos extrapolar ni comparar nuestros resultados. Sin embargo, y dado lo anteriormente expuesto, sí que parece que el alelo T se puede relacionar, al igual que en nuestra investigación, y como probable hipótesis, con la activación de la vía inflamatoria en diferentes patologías.

### **Polimorfismos rs2230774 y rs978906 del gen *ROCK2*.**

Como se ha mencionado, la isoforma ROCK2 de las rho-quinasas parece expresarse en mayor medida en las células vasculares y miocardiocitos. En nuestro conocimiento, existen todavía pocos estudios que hayan probado una relación existente entre polimorfismos de este gen y enfermedad. Más concretamente, no encontramos estudios que hayan relacionado el polimorfismo rs2230774 o el rs978906 del gen *ROCK2* con la hepatopatía alcohólica u otras patologías relacionadas con etanol. En nuestro trabajo, no hemos encontrado diferencias significativas en ninguna de las comparaciones realizadas y por tanto no podemos establecer relación entre la distribución de estos polimorfismos en el grupo de pacientes con alcoholismo y controles o entre los que desarrollan hepatopatía o no dentro del grupo de alcohólicos. Tampoco hemos encontrado resultados significativos en el análisis global de la muestra ni en el análisis específico de los casos entre la expresión de ROCK2 y los diferentes genotipos de los tres polimorfismos estudiados.

En la revisión de publicaciones y trabajos realizados con el polimorfismo rs2230774 , hemos encontrado estudios que asocian la presencia del alelo C y el genotipo CC al síndrome metabólico.<sup>81</sup> Como se ha comentado previamente, parece que la activación de la vía de las rho-quinasas induciría un estado pro-inflamatorio, reduciendo el transporte de glucosa y aumentando la resistencia a la insulina. Kalender et al,<sup>251</sup> demostraron cómo la presencia de homocigosis en el polimorfismo Thr431Asn del *ROCK2* en una población turca, podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de metástasis óseas, pulmonares y hepáticas en el cáncer de mama.

Por otro lado, Seasholtz et al,<sup>252</sup> demostraron que el alelo T del polimorfismo rs2230774 de la *ROCK2* predice un aumento de la resistencia vascular y la tensión arterial en respuesta al sistema renina-angiotensina en gemelos caucásicos, mientras que Pandey et al,<sup>135</sup> demostraron que el genotipo TT se encontraba asociado a la hipertensión esencial en grandes altitudes. Sin embargo otros estudios, principalmente en población china, no han conseguido demostrar esta asociación entre dicho polimorfismo y la hipertensión arterial.<sup>253</sup>

Para finalizar, comentar que otros estudios han intentado relacionar el polimorfismo rs2230774 con un mayor riesgo de padecer ictus isquémico<sup>139</sup> o enfermedad de Beçhet,<sup>83</sup> así como una mayor probabilidad de desarrollar glaucoma de ángulo abierto primario, retinopatía diabética, cáncer colorrectal o linfoma de las células del manto, entre otras enfermedades sin éxito.<sup>140, 249, 254, 255</sup>

En la revisión de trabajos realizados respecto al polimorfismo rs978906, hemos comentado con anterioridad el trabajo de Liao et al,<sup>133</sup> llevado a cabo en población china, demostrando una mayor actividad de la *ROCK2* en pacientes portadores de este polimorfismo, con un aumento de la rigidez arterial carotídea en paciente portadores del alelo T. En el caso del trabajo de Yang et al,<sup>134</sup> la mediación de la *ROCK2* en la respuesta inflamatoria sería causa de disfunción endotelial y activación plaquetaria, lo cual explicaría cómo en el análisis de más de 2000 pacientes de origen chino, la posesión del alelo T de nuestro polimorfismo se asoció a un riesgo mayor de ictus isquémico frente a la población control.

Por otro lado, y como hemos comentado previamente, Pandey et al,<sup>135</sup> consiguieron asociar la posesión del genotipo GG de nuestro polimorfismo en una población india a un mayor riesgo de hipertensión esencial asociados a la altitud. Paradójicamente, trabajos realizados en población china por Liu et al,<sup>253</sup> y en población coreana por Yoo et al,<sup>256</sup> no encontraron relación entre nuestro polimorfismo y el riesgo de enfermedad cardiovascular o angina vasoespástica respectivamente, por lo que puede que exista un componente racial en la potencia de actuación de dicho polimorfismo o bien que sean necesarios otros factores epigenéticos para obtener resultados significativos.

Tanto en el caso del polimorfismo rs2230774 como en el presente del gen *ROCK2*, esta ausencia de resultados en la EHA contrasta con el polimorfismo rs35996865 del gen *ROCK1*, pudiendo ser explicado por esa mayor presencia de la ROCK1 en células relacionadas con la inmunidad, tanto a nivel hepático como cerebral, tal y como se ha explicado previamente y, sobre todo, con una menor presencia de la ROCK2 en estas situaciones. Por este mismo motivo se podrían explicar los estudios positivos encontrados con ambos polimorfismos de la ROCK2 en los casos relacionados con enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, etc., dada su mayor presencia en miocardiocitos y células del músculo liso y endoteliales.

La implicación de la actividad del gen *ROCK2* en la contractibilidad del músculo liso así como por su participación en la cascada celular que ocurre cuando las células endoteliales están expuestas al estímulo inflamatorio, el aumento de la vasoconstricción así como la inhibición de la producción de óxido nítrico al inhibir la óxido nítrico sintetasa de las células endoteliales, sería la posible hipótesis que relacionarían la participación de los polimorfismos rs2230774 y rs978906 de este gen



con un aumento de la rigidez arterial y el riesgo de hipertensión esencial a grandes alturas o un mayor riesgo de ictus isquémico. Por otro lado, el estado proinflamatorio que producen, estaría ligado a una mayor resistencia a la insulina y la aparición de síndrome metabólico.

Un punto en común a tener en cuenta entre estos dos polimorfismos y el polimorfismo rs35996865 del *ROCK1* es su mayor implicación en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer (e incluso, como ha sido relacionado en el polimorfismo rs2230774 del *ROCK2*, también con un mayor riesgo de metástasis en el cáncer de mama). Ello nos permite generar la hipótesis de una mayor implicación de las rho-quinasa en las vías que influyen en el desarrollo del cáncer, teniendo en cuenta un papel aparentemente mayor de estos dos polimorfismos del gen *ROCK2* en la vía inflamatoria implicada a nivel vascular.

De manera resumida, elaboramos la siguiente tabla sobre nuestros tres polimorfismos estudiados y su asociación o no con diferentes enfermedades:

**Tabla 23.** Enfermedades relacionadas con el polimorfismo rs35996865 del gen *ROCK1*.

Enfermedades relacionadas con el polimorfismo rs35996865 del gen <i>ROCK1</i>	Significación	Referencia
Esclerosis sistémica	Sí	Pehlivan et al. <sup>128</sup>
Cáncer renal de células claras	Sí	Zhao et al. <sup>131</sup>
Recidiva del cáncer de próstata	Sí	Liu et al. <sup>132</sup>
Cáncer colorrectal	Sí	Sari et al., <sup>249</sup> Zucchini et al. <sup>250</sup>
Síndrome metabólico	Sí	Tabur et al. <sup>81</sup>
Síndrome de distrés respiratorio en neonatos	Sí	Kaya et al. <sup>129</sup>
Paladar hendido de carácter no sindrómico	Sí	Palmieri et al. <sup>257</sup>
Enfermedad de Beçhet	No	Oguz et al. <sup>130</sup>
Glaucoma de ángulo abierto primario	No	Demiryürek et al. <sup>140</sup>

**Tabla 24.** Enfermedades relacionadas con el polimorfismo rs2230774 del gen *ROCK2*.

<b>Enfermedades relacionadas con el polimorfismo rs2230774 del gen <i>ROCK2</i></b>	<b>Significación</b>	<b>Referencia</b>
Síndrome metabólico	Sí	Tabur et al. <sup>81</sup>
Enfermedad metastásica en cáncer de mama	Sí	Kalender et al. <sup>251</sup>
Hipertensión arterial	Sí	Seasholtz et al. <sup>252</sup>
Hipertensión arterial en grandes altitudes	Sí	Pandey et al. <sup>135</sup>
Rigidez arterial	Sí	Liao et al. <sup>133</sup>
Enfermedad renal crónica	Sí	Yoshida et al. <sup>258</sup>
Edema pulmonar en grandes altitudes	No	Pandey et al. <sup>259</sup>
Cáncer colorrectal	No	Sari et al. <sup>249</sup>
Linfoma de las células del manto	No	Oguz et al. <sup>130</sup>
Glaucoma de ángulo abierto primario	No	Demiryürek et al. <sup>140</sup>
Preeclampsia	No	Peterson et al. <sup>260</sup>
Angina vasoespástica	No	Yoo et al. <sup>256</sup>
Defectos septales	No	Aksoy et al. <sup>261</sup>
Esclerosis sistémica	No	Pehlivan et al. <sup>128</sup>
Enfermedad de Beçhet	No	Oguz et al. <sup>130</sup>
Síndrome de distrés respiratorio en neonatos	No	Kaya et al. <sup>129</sup>
Vejiga hiperactiva	No	Gurocak et al. <sup>262</sup>
Epilepsia generalizada idiopática	No	Yigiter et al. <sup>263</sup>
Migraña	No	Uslu et al. <sup>264</sup>

**Tabla 25.** Enfermedades relacionadas con el polimorfismo rs978906 del gen *ROCK2*.

<b>Enfermedades relacionadas con el polimorfismo rs978906 del gen <i>ROCK2</i></b>	<b>Significación</b>	<b>Referencia</b>
Rigidez arterial	Sí	Liao et al. <sup>133</sup>
Ictus isquémico	Sí	Yang et al. <sup>134</sup>
Hipertensión arterial en grandes altitudes	Sí	Pandey et al. <sup>135</sup>
Enfermedad cardiovascular	No	Liu et al. <sup>253</sup>
Angina vasoespástica	No	Yoo et al. <sup>256</sup>
Edema pulmonar en grandes altitudes	No	Pandey et al. <sup>259</sup>

## 5. CONCLUSIONES

1. El consumo agudo e intensivo de alcohol produce un aumento de la expresión en sangre del ARNm de ambas isoformas de las rho-quinasas, sobre todo en menores de 27 años y mujeres.
2. El aumento de la expresión del ARNm de la isoforma ROCK1 tras el consumo intensivo de alcohol se correlaciona de forma estadísticamente significativa con la expresión de ARNm de IL1- $\beta$ , IL-8 y TLR4.
3. Existe un aumento de expresión del ARNm de la isoforma ROCK1 en las CMSP expuestas a etanol, LPS y, en mayor medida, en la exposición conjunta a etanol y LPS.
4. Se constata un aumento de expresión del ARNm de la isoforma ROCK1 en astrocitos de ratón expuestos a etanol, pero no a LPS o a la combinación de ambas sustancias.
5. No se ha encontrado una asociación clara entre los polimorfismos rs35996865 del gen *ROCK1*, o rs2230774 y rs978906 del gen *ROCK2* con la presencia de hepatopatía alcohólica o alcoholismo.
6. La presencia del alelo T del polimorfismo rs35996865 del gen *ROCK1* se asocia con una mayor expresión de ARNm de ROCK1 en la sangre de individuos jóvenes tras el consumo agudo e intensivo de alcohol.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Patrick CH. Alcohol, Culture, and Society. Durham, NC: Duke University Press; 1952.
2. Reuben A. Wine hath drowned more men than the sea. Hepatology. W.B. Saunders; 2002;1;36:516–8.
3. Génesis 9:20-22.
4. Vallee BL. Alcohol in the western world. Sci Am. 1998;278:80–5.
5. Muir F. An irreverent and thoroughly incomplete social history of almost everything. New York: Stein and Day, 1976:301.
6. Taape T. Distilling reliable remedies: Hieronymus Brunschwig's Liber de arte distillandi (1500) between alchemical learning and craft practice. Ambix. 2014. 21 p.
7. Thurn RJ. The gin plague. Minn Med 1978;61:241-243.
8. Blocker JS, Fahey DM, Tyrrell IR. Alcohol and Temperance in Modern History. ABC-CLIO; 2003.
9. Curtis A, Vandenberg B, Mayshak R, Coomber K, Hyder S, Walker A, et al. Alcohol use in family, domestic and other violence: Findings from a cross-sectional survey of the Australian population. Drug Alcohol Rev. 2019 ;38:349–58.
10. Gunn C, Mackus M, Griffin C, Munafò MR, Adams S. A systematic review of the next-day effects of heavy alcohol consumption on cognitive performance. Addiction. 2018;113:2182–93.

11. Sudhinaraset M, Wigglesworth C. Social and Cultural Contexts of Alcohol Use: Influences in a Social–Ecological Framework. *Alcohol research: Current reviews* 2016.
12. Grant BF, Chou SP, Saha TD, Pickering RP, Kerridge BT, Ruan WJ, et al. Prevalence of 12-Month Alcohol Use, High-Risk Drinking, and DSM-IV Alcohol Use Disorder in the United States, 2001-2002 to 2012-2013: Results From the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *JAMA Psychiatry*. 2017;74:911–23.
13. Shield KD, Kehoe T, Gmel G, Rehm MX, Rehm J (2012a). Societal burden of alcohol. In: Anderson P, Møller L, Galea G, editors. *Alcohol in the European Union. Consumption, harm and policy approaches*. Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe:10–28.
14. Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
15. Guirguis, J., Chhatwal, J., Dasarathy, J., Rivas, J., McMichael, D., Nagy, L. E., McCullough, A. J. and Dasarathy, S. Clinical Impact of Alcohol-Related Cirrhosis in the Next Decade: Estimates Based on Current Epidemiological Trends in the United States. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2015;39: 2085–2094.
16. Gowing LR, Ali RL, Allsop S, Marsden J, Turf EE, West R, et al. Global statistics on addictive behaviours: 2014 status report. *Addiction*. 2015;110:904–19.
17. Hedden SL. Behavioral health trends in the United States: results from the 2014 National Survey on Drug Use and Health. 2015.

18. Estadísticas del Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías (OEDT) 2017. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Disponible en: <http://www.pnsd.mscbs.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/home.html>.
19. Encuesta sobre alcohol y otras drogas en España (EDADES 2017-2018). Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Disponible en: <https://pnsd.sanidad.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/home.htm>
20. Defunciones según la causa de muerte 2018. Instituto Nacional de Estadística. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Disponible en: <http://pestadistico.inteligenciadegestion.msssi.es/publicoSNS/comun/Cubo.aspx?IdNo=5002#no-back-button>
21. Estudio sobre uso de drogas en enseñanzas secundarias en España (ESTUDES 2018-2019). Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Disponible en: <https://pnsd.sanidad.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/home.htm>
22. VII Plan Regional sobre Drogas de Castilla y León 2017-2021. Junta de Castilla y León. Disponible en: <https://familia.jcyl.es/web/jcyl/Familia/es/Plantilla100Detalle/1246988963464/Programa/1284828004507/Comunicación>.
23. Osna NA, Donohue TM, Kharbanda KK. Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and Current Management. *Alcohol Res.* 2017;38:147-61.
24. Rock CL, Thomson C, Gansler T, Gapstur SM, McCullough ML, Patel AV, et al. American Cancer Society guideline for diet and physical activity for cancer prevention. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2020;5:65.

25. Rehm J, Taylor B, Mohapatra S, Irving H, Baliunas D, Patra J, et al. Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Rev* 2010;29:437-445.
26. Lieber CS, Jones DP, Decarli LM. Effects of prolonged ethanol intake: production of fatty liver despite adequate diets. *J Clin Invest* 1965;44: 1009-1021.
27. Torruellas C, French SW, Medici V. Diagnosis of alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20:11684-99.
28. Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* 2011;141:1572-1585.
29. Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol* 2002;27:63-8.
30. Park B-J, Lee Y-J, Lee H-R. Chronic liver inflammation: clinical implications beyond alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20:2168–75.
31. Louvet A, Mathurin P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12:231-42.
32. De Minicis S, Brenner DA. Oxidative stress in alcoholic liver disease: role of NADPH oxidase complex. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23 Suppl 1:S98-103.
33. Lieber CS. Alcohol: its metabolism and interaction with nutrients. *Annu Rev Nutr* 2000;20:395-430.
34. Gong P, Cederbaum AI, Nieto N. Heme oxygenase-1 protects HepG2 cells against cytochrome P450 2E1-dependent toxicity. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004;36:307-18.

35. Luedde T, Kaplowitz N, Schwabe RF. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology*. Elsevier; 2014;147:765-783.
36. Camicia G, de Larrañaga G. Trampas extracelulares de neutrófilos: un mecanismo de defensa con dos caras. *Medicina Clinica*. 2013;140:70-5.
37. Boe DM, Curtis BJ, Chen MM, Ippolito JA, Kovacs EJ. Extracellular traps and macrophages: new roles for the versatile phagocyte. *J Leukoc Biol*. 2015;97:1023–35.
38. Lau AH, Thomson AW, Colvin BL. Chronic ethanol exposure affects in vivo migration of hepatic dendritic cells to secondary lymphoid tissue. *Hum Immunol*. 2007;68:577-85.
39. Laso FJ, Vaquero JM, Almeida J, Marcos M, Orfao A. Chronic alcohol consumption is associated with changes in the distribution, immunophenotype, and the inflammatory cytokine secretion profile of circulating dendritic Cells. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007;31:846-54.
40. Mathews S, Feng D, Maricic I, Ju C, Kumar V, Gao B. Invariant natural killer T cells contribute to chronic-plus-binge ethanol-mediated liver injury by promoting hepatic neutrophil infiltration. *Cell Mol Immunol*. 2015;13:206-16.
41. Arjona A, Boyadjieva N, Sarkar DK. Circadian rhythms of granzyme B, perforin, IFN-gamma, and NK cell cytolytic activity in the spleen: effects of chronic ethanol. *J Immunol*. 2004;172:2811-7.



42. Keshavarzian A, Farhadi A, Forsyth CB, Rangan J, Jakate S, Shaikh M, et al. Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. *Journal of Hepatology*. 2009;50:538-47.
43. Doggett TM, Breslin JW. Acute alcohol intoxication-induced microvascular leakage. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014 ;38:2414-26.
44. Bala S, Marcos M, Gattu A, Catalano D, Szabo G. Acute binge drinking increases serum endotoxin and bacterial DNA levels in healthy individuals. *PLoS ONE*. 2014;9:e96864.
45. Ceni E, Mello T, Galli A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World J Gastroenterol*. 2014;20:17756-72.
46. Bala S, Marcos M, Kodys K, Csak T, Catalano D, Mandrekar P, et al. Up-regulation of MicroRNA-155 in Macrophages Contributes to Increased Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) Production via Increased mRNA Half-life in Alcoholic Liver Disease. *J Biol Chem*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2011;286:1436-44.
47. Ceccarelli S, Panera N, Mina M, Gnani D, De Stefanis C, Crudele A, et al. LPS-induced TNF- $\alpha$  factor mediates pro-inflammatory and pro-fibrogenic pattern in non-alcoholic fatty liver disease. *Oncotarget*. Impact Journals; 2015;6:41434-52.
48. Byun J-S, Suh Y-G, Yi H-S, Lee Y-S, Jeong W-I. Activation of toll-like receptor 3 attenuates alcoholic liver injury by stimulating Kupffer cells and stellate cells to produce interleukin-10 in mice. *Journal of Hepatology*. Elsevier; 2013;58:3429.

49. Szabo G. Monocytes, Alcohol Use, and Altered Immunity. *Alcohol Clin Exp Res*. Blackwell Publishing Ltd; 1998;22(s5):216-219S.
50. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000;343:1467-76.
51. McClain CJ, Hill DB, Song Z, Deaciuc I, Barve S. Monocyte activation in alcoholic liver disease. *Alcohol* 2002;27:53-61.
52. Laso FJ, Almeida J, Torres E, Vaquero JM, Marcos M, Orfao A. Chronic alcohol consumption is associated with an increased cytotoxic profile of circulating lymphocytes that may be related with the development of liver Injury. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010;34:876-85.
53. Afshar M, Richards S, Mann D, Cross A, Smith GB, Netzer G, et al. Acute immunomodulatory effects of binge alcohol ingestion. *Alcohol*. 2015;49:57-64.
54. Yin M, Wheeler MD, Kono H, et al. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* 1999;117:942-52.
55. Minagawa M, Deng Q, Liu Z-X, Tsukamoto H, Dennert G. Activated natural killer T cells induce liver injury by Fas and tumor necrosis factor- $\alpha$  during alcohol consumption. *Gastroenterology*. Elsevier; 2004;126:1387-99.
56. Ge X, Leung T-M, Arriazu E, Lu Y, Urtasun R, Christensen B, et al. Osteopontin binding to lipopolysaccharide lowers tumor necrosis factor- $\alpha$  and prevents early alcohol-induced liver injury in mice. *Hepatology*. 2014;59:1600-16.
57. Laso FJ, Pastor I, Orfao A. Immune system and alcoholic liver disease. *Medicina Clinica*. 2005;125:263-9.

58. Boule LA, Kovacs EJ. Alcohol, aging, and innate immunity. *J Leukoc Biol.* Society for Leukocyte Biology; 2017;102:41-55.
59. Laso FJ, Iglesias-Osma C, Ciudad J, López A, Pastor I, Orfao A. Chronic alcoholism is associated with an imbalanced production of Th-1/Th-2 cytokines by peripheral blood T cells. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:1306-11.
60. Santos-Pérez JL, Díez-Ruiz A, Luna-Casado L, et al. T-cell activation, expression of adhesion molecules and response to ethanol in alcoholic cirrhosis. *Immunol Lett* 1996;50:179-83.
61. Crews FT, Bechara R, Brown LA, et al. Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:720-30.
62. Molina PE, Happel KI, Zhang P, Kolls JK, Nelson S. Focus on: Alcohol and the immune system. *Alcohol Res Health.* 2010;33(1-2):97-108.
63. Curtis BJ, Zahs A, Kovacs EJ. Epigenetic targets for reversing immune defects caused by alcohol exposure. *Alcohol Res.* 2013;35:97-113.
64. Batey RG, Wang J. Molecular pathogenesis of T lymphocyte-induced liver injury in alcoholic hepatitis. *Front Biosci* 2002;7:d1662-75.
65. Barr, T., Helms, C., Grant, K., Messaoudi, I. Opposing effects of alcohol on the immune system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* 2016;65:242-251.
66. Jerrells TR. Role of activated CD8<sup>+</sup> T cells in the initiation and continuation of hepatic damage. *Alcohol* 2002;27:47-52.

67. Szabo G, Mandrekar P. A Recent Perspective on Alcohol, Immunity, and Host Defense. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009;33:220-32.
68. Szabo G, Saha B. Alcohol's Effect on Host Defense. *Alcohol Res*. 2015;37:159-70.
69. Topiwala A, Allan CL, Valkanova V, Zsoldos E, Filippini N, Sexton C, et al. Moderate alcohol consumption as risk factor for adverse brain outcomes and cognitive decline: longitudinal cohort study. *BMJ. British Medical Journal Publishing Group*; 2017;357:j2353.
70. Heinz A, Goldman D. Genotype effects on neurodegeneration and neuroadaptation in monoaminergic neurotransmitter systems. *Neurochem Int*. 2000;37:425-32.
71. Harper C, Dixon G, Sheedy D, Garrick T. Neuropathological alterations in alcoholic brains. Studies arising from the New South Wales Tissue Resource Centre. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27:951-61.
72. Floreani NA, Rump TJ, Muneer PMA, Alikunju S, Morsey BM, Brodie MR, et al. Alcohol-Induced Interactive Phosphorylation of Src and Toll-like Receptor Regulates the Secretion of Inflammatory Mediators by Human Astrocytes. *J Neuroimmune Pharmacol*. Springer US; 2010;5:533-45.
73. Kane CJM, Phelan KD, Douglas JC, Wagoner G, Johnson JW, Xu J, et al. Effects of ethanol on immune response in the brain: region-specific changes in adolescent versus adult mice. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014;38:384-91.

74. Blanco AM, Valles SL, Pascual M, Guerri C. Ethanol-induced iNOS and COX-2 expression in cultured astrocytes via NF-kappaB. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004;28(Supplement):23A.
75. Suk K, Lee J, Hur J, Kim YS, Lee MS, Cha S, Kim S and Kim H. Activation-induced cell death of rat astrocytes. *Brain Res* 900, 342-347 (2005).
76. Pascual M, Valles SL, Renau-Piqueras J and Guerri C. Ceramide pathways modulate ethanol-induced cell death in astrocytes. *J Neurochem* 83, 1535-1545 (2007).
77. Adermark L, Bowers MS. Disentangling the Role of Astrocytes in Alcohol Use Disorder. *Alcohol Clin Exp Res.* 2016;40:1802-16.
78. Gómez GI, Falcon RV, Maturana CJ, Labra VC, Salgado N, Rojas CA, et al. Heavy Alcohol Exposure Activates Astroglial Hemichannels and Pannexons in the Hippocampus of Adolescent Rats: Effects on Neuroinflammation and Astrocyte Arborization. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:4.
79. Arencibia JM, Pastor-Flores D, Bauer AF, Schulze JO, Biondi RM. AGC protein kinases: from structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1834:1302-21.
80. Shimizu T, Liao JK. Rho Kinases and Cardiac Remodeling. *Circ J.* 2016;80:1491-8.
81. Tabur S, Oztuzcu S, Oguz E, Korkmaz H, Eroglu S, Ozkaya M, et al. Association of Rho/Rho-kinase gene polymorphisms and expressions with obesity-related metabolic syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19:1680–8.

82. Rodriguez PL, Sahay S, Olabisi OO, Whitehead IP. ROCK I-mediated activation of NF-kappaB by RhoB. *Cell Signal*. 2007;19:2361-9.
83. Oguz E, Alasehirli B, Pehlivan Y, Onat AM, Oztuzcu S, Ozkara E, et al. Association between Rho-kinase (ROCK2) gene polymorphisms and Behçet's disease. *Transl Res. Elsevier*; 2012;160:428-34.
84. Pernis AB, Ricker E, Weng C-H, Rozo C, Yi W. Rho kinases in autoimmune diseases. *Annu Rev Med*. 2016;67:355-74.
85. Wang C, Song S, Zhang Y, Ge Y, Fang X, Huang T, et al. Inhibition of the Rho/Rho kinase pathway prevents lipopolysaccharide-induced hyperalgesia and the release of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the mouse spinal cord. *Sci Rep. Nature Publishing Group*; 2015;5:14553.
86. Julian L, Olson MF. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. *Small GTPases*. 2014;5:e29846.
87. Ward Y, Yap S-F, Ravichandran V, Matsumura F, Ito M, Spinelli B, et al. The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho kinase pathway. *J Cell Biol*. 2002;157:291-302.
88. Rana MK, Worthylake RA. Novel mechanism for negatively regulating Rho-kinase (ROCK) signaling through Coronin1B protein in neuregulin 1 (NRG-1)-induced tumor cell motility. *J Biol Chem*. 2012;287:21836-45.
89. Desouza M, Gunning PW, Stehn JR. The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis. *Bioarchitecture*. 2012;2:75-87.

90. Feng Y, LoGrasso PV, Defert O, Li R. Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potential. *J Med Chem.* 2016;59:2269-300.
91. Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Sauzeau V, Bourreille A, Hilaret G, Cario-Toumaniantz C, Pacaud P, Galmiche JP, Loirand G. Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor kappa B inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis. *Gastroenterology.* 2003;124:1180-7.
92. Thorlacius K, Slotta JE, Laschke MW, Wang Y, Menger MD, Jeppsson B, et al. Protective effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, on chemokine expression, leukocyte recruitment, and hepatocellular apoptosis in septic liver injury. *J Leukoc Biol.* 2006;79:923-31.
93. Sone T. Development of Fasudil Hydrochloride (Eril®) : A New Protein Kinase Inhibitor. *Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan. The Society of Synthetic Organic Chemistry, Japan;* 1996;54:794-800.
94. Shin HK, Salomone S, Potts EM, Lee S-W, Millican E, Noma K, et al. Rho-Kinase Inhibition Acutely Augments Blood Flow in Focal Cerebral Ischemia via Endothelial Mechanisms. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;27:998-1009.
95. Shimokawa H, Sunamura S, Satoh K. RhoA/Rho-Kinase in the Cardiovascular System. *Circ Res. American Heart Association, Inc;* 2016;118:352-66.
96. Wang Z-H, Zhu D, Xie S, Deng Y, Pan Y, Ren J, et al. Inhibition of Rho-kinase attenuates left ventricular remodeling caused by chronic intermittent hypoxia in rats via suppressing myocardial inflammation and apoptosis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2017;17:187-99.

97. Zhou Q, Gensch C, Liao JK. Rho-associated coiled-coil-forming kinases (ROCKs): potential targets for the treatment of atherosclerosis and vascular disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32:167-73.
98. Loirand G, Pacaud P. Involvement of Rho GTPases and their regulators in the pathogenesis of hypertension. *Small GTPases.* 2014;5:1-10.
99. Lee SH, Huang H, Choi K, Lee DH, Shi J, Liu T, et al. ROCK1 isoform-specific deletion reveals a role for diet-induced insulin resistance. *AJP: Endocrinology and Metabolism.* 2014;306:E332-43.
100. Pernis AB, Ricker E, Weng C-H, Rozo C, Yi W. Rho kinases in autoimmune diseases. *Annu Rev Med.* 2016;67:355-74.
101. Lochhead PA, Wickman G, Mezna M, Olson MF. Activating ROCK1 somatic mutations in human cancer. *Oncogene.* 2010;29:2591-8.
102. Fleuren EDG, Zhang L, Wu J, Daly RJ. The kinome “at large” in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016;16:83-98.
103. Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:837-48.
104. Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R, Lacal JC. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* 1997;11:463-75.
105. Rahman A, Fazal F. Blocking NF-κB: an inflammatory issue. *Proceedings of the American Thoracic Society.* 2011;8:497-503.



106. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts. P. Walter. Molecular biology of the cell. Sixth edition. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group; 2015.
107. Barros LF, Kanaseki T, Sabirov R, Morishima S, Castro J, Bittner CX, et al. Apoptotic and necrotic blebs in epithelial cells display similar neck diameters but different kinase dependency. *Cell Death Differ.* 2003;10:687-97.
108. Hall A. Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science.* 1998;279:509-14.
109. Coleman ML, Olson MF. Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death Differ.* 2002;9:493-504.
110. Miñambres R, Guasch RM, Perez-Aragó A, Guerri C. The RhoA/ROCK-I/MLC pathway is involved in the ethanol-induced apoptosis by anoikis in astrocytes. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 2):271-82.
111. Guasch RM, Tomas M, Miñambres R, Valles S, Renau-Piqueras J, Guerri C. RhoA and lysophosphatidic acid are involved in the actin cytoskeleton reorganization of astrocytes exposed to ethanol. *J Neurosci Res.* 2003;72:487-502.
112. Guasch RM, Blanco AM, Perez-Aragó A, Miñambres R, Talens-Visconti R, Peris B, et al. RhoE participates in the stimulation of the inflammatory response induced by ethanol in astrocytes. *Exp Cell Res.* 2007;313:3779-88.
113. Martínez SE, Lázaro-Diéguez F, Selva J, Calvo F, Piqueras J-R, Crespo P, et al. Lysophosphatidic acid rescues RhoA activation and phosphoinositides levels in astrocytes exposed to ethanol. *J Neurochem.* 2007;102:1044-52.

114. Vogel F, Motulsky AG. Human genetics. Problems and Approaches, 4<sup>th</sup> ed. Berlin: Springer-Verlag; 2010.
115. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860-921.
116. Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine--a primer. *N Engl J Med* 2002;347:1512-20.
117. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1304-51.
118. Sankaran VG, Nathan DG. Thalassemia: an overview of 50 years of clinical research. *Hematol Oncol Clin North Am* 2010;24: 1005-20.
119. Jiménez ML, Mallorquín P, García MV. Genotipado en la salud humana. 2005. 1<sup>a</sup> ed. Madrid: Genoma España; 2005.
120. Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 2002;4:45-61.
121. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Opinion: candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet*. 2002;3:391-7.
122. Daly AK, Day CP. Candidate gene case-control association studies: advantages and potential pitfalls. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:489-99.
123. Hart AB, Kranzler HR. Alcohol Dependence Genetics: Lessons Learned From Genome-Wide Association Studies (GWAS) and Post-GWAS Analyses. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015;39:1312–27.

124. Mbarek H, Milaneschi Y, Fedko IO, Hottenga J-J, de Moor MHM, Jansen R, et al. The genetics of alcohol dependence: Twin and SNP-based heritability, and genome-wide association study based on AUDIT scores. *Am J Med Genet.* 2015;168:739-48.
125. Sanchez-Roige S, Fontanillas P, Elson S, Gray J, de Wit H, Davis L, et al. Genome-wide association study of alcohol use disorder identification test (AUDIT) scores in an unselected cohort of 20,328 research participants of european ancestry. *European Neuropsychopharmacology.* 2019;29:S801-2.
126. Buch S, Stickel F, Trépo E, Way M, Herrmann A, Nischalke HD, et al. A genome-wide association study confirms PNPLA3 and identifies TM6SF2 and MBOAT7 as risk loci for alcohol-related cirrhosis. *Nat Genet.* 2015;47:1443-8.
127. Chamorro AJ, Torres JL, Mirón-Canelo JA, González-Sarmiento R, Laso FJ, Marcos M. Systematic review with meta-analysis: the I148M variant of patatin-like phospholipase domain-containing 3 gene (PNPLA3) is significantly associated with alcoholic liver cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;40:571-81.
128. Pehlivan Y, Yolbas S, Cetin GY, Alibaz-Oner F, Cagatay Y, Yilmaz N, et al. Investigation of the association between Rho/Rho-kinase gene polymorphisms and systemic sclerosis. *Rheumatol Int. Springer Berlin Heidelberg;* 2016;36:421-7.
129. Kaya G, Sivasli E, Oztuzcu S, Melekoglu NA, Ozkara E, Sarikabadayi U, et al. Association of Rho-kinase Gene Polymorphisms with Respiratory Distress Syndrome in Preterm Neonates. *Pediatr Neonatol.* 2017;58:36-42.
130. Oguz E, Demiryurek AT, Pehlivan Y, Kisacik B, Ozkara E, Oztuzcu S, et al. Association of Rho-kinase 1 (ROCK1) Gene Polymorphisms with Behçet's Disease.

Mol Diagn Ther. 2014;18:419-26.

131. Zhao R, Liu K, Huang Z, Wang J, Pan Y, Huang Y, et al. Genetic Variants in Caveolin-1 and RhoA/ROCK1 Are Associated with Clear Cell Renal Cell Carcinoma Risk in a Chinese Population. PLoS ONE. 2015;10:e0128771.

132. Liu K, Li X, Wang J, Wang Y, Dong H, Li J. Genetic variants in RhoA and ROCK1 genes are associated with the development, progression and prognosis of prostate cancer. Oncotarget. 2017;8:19298-309.

133. Liao Y-C, Liu P-Y, Lin H-F, Lin W-Y, Liao JK, Juo S-HH. Two functional polymorphisms of ROCK2 enhance arterial stiffening through inhibiting its activity and expression. J Mol Cell Cardiol. 2015;79:180-6.

134. Yang S, Zhao Y, Tian Y, Chen Y, Zhao X, Li Y, et al. Common variants of ROCKs and the risk of hypertension, and stroke: Two case-control studies and a follow-up study in Chinese Han population. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2018;1864:778-83.

135. Pandey P, Mohammad G, Singh Y, Pasha MAQ. Polymorphisms and haplotype of ROCK2 associate with high altitude essential hypertension in native high altitude Ladakhi Indian population: a preliminary study. Clinical and Experimental Hypertension. 2016;38:238-44.

136. Shimokawa H. Rho-kinase as a novel therapeutic target in treatment of cardiovascular diseases. J Cardiovasc Pharmacol 2002;39:319-27.

137. Prieto D, Contreras C, Sánchez A. Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. Curr Vasc Pharmacol 2014;12:412-426.

138. Sordella R, Jiang W, Chen GC, Curto M, Settleman J. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. *Cell* 2003;113:147-158.
139. Zee RY, Wang QM, Chasman DI, Ridker PM, Liao JK. Gene variations of ROCKs and risk of ischaemic stroke: The Women's Genome Health Study. *Clinical Science (Lond)*. 2014;126:829-835.
140. Demiryürek S, Okumus S, Bozgeyik İ, Oztuzcu S, Coskun E, Mat E, et al. Investigation of the Rho-kinase Gene Polymorphism in Primary Open-angle Glaucoma. *Ophthalmic Genetics*. 2016;42:1-4.
141. Lin Z, Chiang NY, Chai N, Seshasayee D, Lee WP, Balazs M, et al. In vivo antigen-driven plasmablast enrichment in combination with antigen-specific cell sorting to facilitate the isolation of rare monoclonal antibodies from human B cells. *Nat Protoc*. 2014;9:1563–77.
142. Almeida A, Heales SJ, Bolaños JP, Medina JM. Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. *Brain Res*. 1998;20;790:209–16.
143. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 2008;3:1101–8.
144. L. Pinzón Uribe, J. Torres Triana, P. Costa Alba, R. Macías Casanova, M. Pérez Nieto, R. González-Sarmiento, et al. Validación de genes de referencia endógenos para QRT-PCR en muestras humanas de sangre periférica para estudio en pacientes con consumo intensivo de alcohol. *Rev Clin Esp*. 2015;215 (Espec Congr):808.

145. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006;1:1559–82.
146. Dooms M, Chango A, Abdel-Nour A. [Quantitative PCR (qPCR) and the guide to good practices MIQE: adapting and relevance in the clinical biology context]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2014;72:265–9.
147. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993;11:1026-30.
148. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:7276-80.
149. Ohashi J, Yamamoto S, Tsuchiya N, et al. Comparison of statistical power between 2\*2 allele frequency and allele positivity tables in case-control studies of complex disease genes. *Ann Hum Genet* 2001;65:197-206.
150. Song JW, Chung KC. *Observational Studies: Cohort and Case-Control Studies*. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2010;126:2234–42.
151. López-Moreno JA, Marcos M, Calleja-Conde J, et al. Histone Deacetylase Gene Expression Following Binge Alcohol Consumption in Rats and Humans. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015 39:1939-50.
152. Gil P. *Medicina PrEventiva y Salud Pública* 10ª Edición. Editorial Masson. 2002.
153. Cummings P, Weiss S N. Cases series and exposure series: the role of studies without in providing information about the etiology of injury of disease. *Injury Prevention*. 1998;4:54-7.

154. Yang SR, Chida AS, Bauter MR, et al. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kappaB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291:46-57.
155. Bermudez EA, Rifai N, Buring J, Manson JE, Ridker PM. Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;1;22:1668-73.
156. Tobacco Smoking Inhibits Expression of Proinflammatory Cytokines and Activation of IL-1RAssociated Kinase, p38, and NF-  $\kappa$ B in Alveolar Macrophages Stimulated with TLR2 and TLR4 Agonists. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2007;179:6097-6106.
157. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech*. 2004;15:155-66.
158. Multiplexed Serum Cytokine Concentrations in Healthy Subjects. *PloS one*. 2013;12;8:76091.
159. Morris CJ, Purvis TE, Hu K, Scheer FAJL. Circadian misalignment increases cardiovascular disease risk factors in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113:E1402–11.
160. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental hematology* 2002;30:503-12.
161. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 2009;55:611-22.

162. Grubbs, F. E. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. *Technometrics*, Vol. 11, No. 4, 1969, pp. 1-21.
163. Torres Triana J.L. Expresión de PPAR- $\gamma$  y miR-27 en el tejido adiposo de pacientes obesos (tesis doctoral). Salamanca. Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina; Universidad de Salamanca. 2015.
164. Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, et al. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem*. 2002;309:293-300.
165. Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology* 2004;59:566-73.
166. Lamba V, Ghodke-Puranik Y, Guan W, Lamba JK. Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation. *BMC research notes* 2014;7:129.
167. Sanders R, Mason DJ, Foy CA, Huggett JF. Considerations for accurate gene expression measurement by reverse transcription quantitative PCR when analyzing clinical samples. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406:6471–83.
168. Costa Alba P. Análisis de la respuesta inflamatoria mediada por receptores tipo toll tras el consumo intensivo de alcohol o binge drinking (tesis doctoral). Salamanca. Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina; Universidad de Salamanca. 2016.



169. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* 2004;26:509-15.
170. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;18:3.
171. Rohini Mehta AB, Noreen Hossain, Arian Afendy, Vikas Chandhoke, Zobair Younossi, et el. Validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis of human visceral adipose samples. *BMC Mol Biol.* 2010; 21; 11:39.165.
172. Macías R, Torres JL, Manzanedo L, et al. Validación de genes de referencia endógenos para qRT-PCR en muestras humanas de tejido adiposo visceral y periférico para estudio en pacientes con obesidad. *Revista Clínica Española.* 2014;214:1310.
173. Boujedidi H, Bouchet-Delbos L, Cassard-Doulcier AM, et al. Housekeeping genevariability in the liver of alcoholic patients. *Alcoholism, clinical and experimental research* 2012;36:258-66.
174. Hiroki J. Inflammatory stimuli upregulate Rho-kinase in human coronary vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37:537–46.
175. Zhou N, Lee J-J, Stoll S, Ma B, Costa KD, Qiu H. Rho Kinase Regulates Aortic Vascular Smooth Muscle Cell Stiffness Via Actin/SRF/Myocardin in Hypertension. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44:701–15.

176. Büyükaşar K, Arıkan O, Ark M, Kubat H, Özveren E. Upregulation of Rho-kinase (ROCK-2) expression and enhanced contraction to endothelin-1 in the mesenteric artery from lipopolysaccharide-treated rats. *Eur J Pharmacol.* 2004;498:211–7.
177. Erol A, Karpyak VM. Sex and gender-related differences in alcohol use and its consequences: Contemporary knowledge and future research considerations. *Drug Alcohol Depend.* 2015;156:1-13.
178. Wilsnack RW, Wilsnack SC, Gmel G, Kantor LW. Gender Differences in Binge Drinking. *Alcohol Res.* 2018;39:57-76.
179. Pascual M, Montesinos J, Marcos M, et al. Gender differences in the inflammatory cytokine and chemokine profiles induced by binge ethanol drinking in adolescence. *Addict Biol.* 2017;22:1829-1841.
180. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Human Reproduction Update.* 2005;11:411–23.
181. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol.* Nature Publishing Group; 2016;16:626–38.
182. Oertelt-Prigione S. The influence of sex and gender on the immune response. *Autoimmun Rev.* 2012;11:A479–85.
183. Klein SL, Jedlicka A, Pekosz A. The Xs and Y of immune responses to viral vaccines. *The Lancet Infectious Diseases.* Elsevier Ltd; 2010.10:338–49.
184. Gubbels Bupp MR, Potluri T, Fink AL, Klein SL. The Confluence of Sex Hormones and Aging on Immunity. *Front Immunol.* Frontiers; 2018.9:2095-15.

185. White A, Hingson R. The burden of alcohol use: excessive alcohol consumption and related consequences among college students. *Alcohol Res.* 2013;35:201–18.
186. Tapert SF, Schweinsburg AD. The human adolescent brain and alcohol use disorders. *Recent Dev Alcohol.* 4 ed. New York: Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers; 2005;17:177–97.
187. Husain K, Ansari RA, Ferder L. Alcohol-induced hypertension: Mechanism and prevention. *World J Cardiol.* 2014;6:245-252.
188. Lee DL, Webb RC, Jin L. Hypertension and RhoA/Rho-kinase signaling in the vasculature: highlights from the recent literature. *Hypertension.* 2004;44:796-9.
189. Tong J, Wang Y, Chang B, Zhang D, Wang B. Y-27632 inhibits ethanol-induced increase in intestinal epithelial barrier permeability. *Mol Med Rep.* 2014;9:2357-2361.
190. Zhao H, Sun X, Tong J. Role of ROCK/NF- $\kappa$ B/AQP8 signaling in ethanol-induced intestinal epithelial barrier dysfunction. *Mol Med Rep.* 2020;22:2253-2262.
191. Rao R. Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease. *Hepatology.* 2009;50:638–644.
192. O'Neill L.A., Golenbock D., Bowie A.G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology.* 2013;13:453–460.
193. Liu S, Gallo DJ, Green AM, et al. Role of toll-like receptors in changes in gene expression and NF-kappa B activation in mouse hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 2002;70:3433-3442.

194. Jia L, Vianna CR, Fukuda M, et al. Hepatocyte Toll-like receptor 4 regulates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Commun.* 2014;5:3878.
195. Jia L, Chang X, Qian S, et al. Hepatocyte toll-like receptor 4 deficiency protects against alcohol-induced fatty liver disease. *Mol Metab.* 2018;14:121-129.
196. Bala S, Marcos M, Gattu A, Catalano D, Szabo G. Acute binge drinking increases serum endotoxin and bacterial DNA levels in healthy individuals. *PLoS One.* 2014;9:e96864.
197. de Jong WJ, Cleveringa AM, Greijdanus B, Meyer P, Heineman E, Hulscher JB. The effect of acute alcohol intoxication on gut wall integrity in healthy male volunteers; a randomized controlled trial. *Alcohol.* 2015;49:65-70.
198. Orio L, Antón M, Rodríguez-Rojo IC, et al. Young alcohol binge drinkers have elevated blood endotoxin, peripheral inflammation and low cortisol levels: neuropsychological correlations in women. *Addict Biol.* 2018;23:1130-1144.
199. Engler H, Benson S, Wegner A, Spreitzer I, Schedlowski M, Elsenbruch S. Men and women differ in inflammatory and neuroendocrine responses to endotoxin but not in the severity of sickness symptoms. *Brain Behav Immun.* 2016;52:18-26.
200. Luo P, Wang F, Wong NK, et al. Divergent Roles of Kupffer Cell TLR2/3 Signaling in Alcoholic Liver Disease and the Protective Role of EGCG. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2020;9(1):145-160.
201. Hong IH, Han SY, Ki MR, et al. Inhibition of kupffer cell activity improves transplantation of human adipose-derived stem cells and liver functions. *Cell Transplant.* 2013;22(3):447-459.

202. Adachi Y., Bradford B.U., Gao W., Bojes H.K., Thurman R.G. Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology*. 1994;20:453–460.
203. Jarvelainen H.A., Fang C., Ingelman-Sundberg M., Lukkari T.A., Sippel H., Lindros K.O. Kupffer cell inactivation alleviates ethanol-induced steatosis and CYP2E1 induction but not inflammatory responses in rat liver. *Journal of Hepatology*. 2000;32:900–910
204. Fujimoto M, Uemura M, Nakatani Y, et al. Plasma endotoxin and serum cytokine levels in patients with alcoholic hepatitis: relation to severity of liver disturbance. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000;24(4 Suppl):48S-54S.
205. Mandrekar P, Catalano D, Jeliaskova V, Kodys K. Alcohol exposure regulates heat shock transcription factor binding and heat shock proteins 70 and 90 in monocytes and macrophages: implication for TNF- $\alpha$  regulation. *J Leukoc Biol*. 2008;84:1335-45.
206. Zhao XJ, Marrero L, Song K, et al. Acute alcohol inhibits TNF- $\alpha$  processing in human monocytes by inhibiting TNF/TNF- $\alpha$ -converting enzyme interactions in the cell membrane. *J Immunol*. 2003;15;170:2923-31.
207. Von Maltzan K, Tan W, Pruett SB. Investigation of the role of TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE) in the inhibition of cell surface and soluble TNF- $\alpha$  production by acute ethanol exposure. *PloS one*. 2012;7:29890.20.
208. Zhang Z, Cork J, Ye P, et al. Inhibition of TNF- $\alpha$  processing and TACE-mediated ectodomain shedding by ethanol. *J Leukoc Biol*. 2000;67:856-862.

209. Pascual M, Blanco AM, Cauli O, Miñarro J, Guerri C. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *Eur J Neurosci*. 2007;25:541-550.
210. Adermark L, Bowers MS. Disentangling the Role of Astrocytes in Alcohol Use Disorder. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016;40:1802-1816.
211. Feldstein Ewing SW, Sakhardande A, Blakemore SJ. The effect of alcohol consumption on the adolescent brain: A systematic review of MRI and fMRI studies of alcohol-using youth. *Neuroimage Clin*. 2014;5:420-437.
212. Petit G, Maurage P, Kornreich C, et al. Binge drinking in adolescents: A review of neurophysiological and neuro-imaging research. *Alcohol*. 2014;49:198-206.
213. Squeglia LM, Sorg SF, Schweinsburg AD, Wetherill RR, Pulido C, Tapert SF. Binge drinking differentially affects adolescent male and female brain morphometry. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012;220:529-539.
214. Boelema SR, Harakeh Z, van Zandvoort MJ, et al. Adolescent Heavy Drinking Does Not Affect Maturation of Basic Executive Functioning: Longitudinal Findings from the TRAILS Study. *PLoS One*. 2015;10:e0139186.
215. Jones SA, Lueras JM, Nagel BJ. Effects of Binge Drinking on the Developing Brain. *Alcohol Res*. 2018;39:87-96.
216. Chung T, Creswell KG, Bachrach R, Clark DB, Martin CS. Adolescent Binge Drinking. *Alcohol Res*. 2018;39:5-15.
217. Stickel F, Osterreicher CH. The Role of Genetic Polymorphisms in Alcoholic Liver Disease. *Alcohol Alcohol* 2006;41:209-24.

218. Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 2003;361:865-72.
219. Daly AK. Candidate gene case-control studies. *Pharmacogenomics* 2003;4:127-39.
220. Sackett DL. Bias in analytic research. *J Chronic Dis* 1979;32:51-63.
221. Liu L, Zhang D, Liu H, Arendt C. Robust methods for population stratification in genome wide association studies. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:132.
222. Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 2003;361:598-604.
223. Panoutsopoulou K, Wheeler E. Key Concepts in Genetic Epidemiology. *Methods Mol Biol*. 2018;1793:7–24.
224. Palmer LJ, Burton, P & Davey Smith G. (2011). *An Introduction to Genetic Epidemiology*. Bristol: Policy Press.
225. Basavarajappa BS. Endocannabinoid System and Alcohol Abuse Disorders. In: *Recent Advances in Cannabinoid Physiology and Pathology*. Cham: Springer International Publishing; 2019; 89-127.
226. Bataller R, Cabezas J, Aller R, Ventura-Cots M, Abad J, Albillos A, et al. Alcohol-related liver disease. Clinical practice guidelines. Consensus document sponsored by AEEH. 2019;657–76.
227. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of alcohol-related liver disease. *Journal of Hepatology*. 2018;69:154–81.

228. Weigand K, Weigand K. Percutaneous liver biopsy: retrospective study over 15 years comparing 287 inpatients with 428 outpatients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24:792–9.
229. Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Gilvarry E, Day CP. Interleukin 10 promoter region polymorphisms and susceptibility to advanced alcoholic liver disease. *Gut* 2000;46:540-5.
230. Nezi V, Deutsch M, Gazouli M, Alexopoulou A, Paparrigopoulos T, Liappas IA, et al. Polymorphisms of the CD14 genes are associated with susceptibility to alcoholic liver disease in greek patients. *Alcohol Clin Exp Res* 2013;37:244-51.
231. Gaiani S, Gramantieri L, Venturoli N, Piscaglia F, Siringo S, D'Errico A, et al. What is the criterion for differentiating chronic hepatitis from compensated cirrhosis? A prospective study comparing ultrasonography and percutaneous liver biopsy. *J Hepatol* 1997;27:979-85.
232. Lavallard VJ, Bonnafous S, Patouraux S, Saint-Paul MC, Rousseau D, Anty R, et al. Serum markers of hepatocyte death and apoptosis are non invasive biomarkers of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *PLoS One* 2011;6:e17599.
233. Lombardi R. Non-invasive assessment of liver fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2015;21:11044.
234. Altamirano J, Qi Q, Choudhry S, Abdallah M, Singal AK, Humar A, et al. Non-invasive diagnosis: non-alcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2020;5:31–1.



235. Nguyen-Khac E, Thiele M, Voican C, Nahon P, Moreno C, Boursier J, et al. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis in patients with alcohol-related liver disease by transient elastography: an individual patient data meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2018;3:614–25.
236. Gordon D, Finch SJ, Nothnagel M, Ott J. Power and sample size calculations for case-control genetic association tests when errors are present: application to single nucleotide polymorphisms. *Hum Hered* 2002;54:22-33.
237. Mein CA, Barratt BJ, Dunn MG, Siegmund T, Smith AN, Esposito L, et al. Evaluation of single nucleotide polymorphism typing with invader on PCR amplicons and its automation. *Genome Res* 2000;10:330-43.
238. Hou L, Sun N, Mane S, Sayward F, Rajeevan N, Cheung K-H, et al. Impact of genotyping errors on statistical power of association tests in genomic analyses: A case study. *Genet Epidemiol*. 2017;41:152–62.
239. Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet* 2005;6:847-59.
240. Hosking L, Lumsden S, Lewis K, Yeo A, McCarthy L, Bansal A, et al. Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Eur J Hum Genet* 2004;12:395-9.
241. Kirk KM, Cardon LR. The impact of genotyping error on haplotype reconstruction and frequency estimation. *Eur J Hum Genet* 2002;10:616-22.
242. Mazzio EA, Soliman KFA. Basic concepts of epigenetics. *Epigenetics*. 2014;7:119–30.

243. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003;33 Suppl:245-54.
244. Warle MC, Farhan A, Metselaar HJ, et al. Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? *Liver Transpl* 2003;9:170-81.
245. Kim S, Zhang K, Sun F. Detecting susceptibility genes in case-control studies using set association. *BMC Genet* 2003;4 Suppl 1:S9.
246. Isordia-Salas I, Leanos-Miranda A, Sainz IM, Reyes-Maldonado E, Borrayo-Sanchez G. Association of the plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism with ST elevation acute myocardial infarction in young patients. *Rev Esp Cardiol* 2009;62:365-72.
247. Hegab AE, Sakamoto T, Saitoh W, Massoud HH, Massoud HM, Hassanein KM, et al. Polymorphisms of IL4, IL13, and ADRB2 genes in COPD. *Chest* 2004;126:1832-9.
248. Rothman KJ. No adjustments are needed for multiple comparisons. *Epidemiology* 1990;1:43-6.
249. Sari I, Berberoglu B, Ozkara E, Oztuzcu S, Camci C, Demiryurek AT. Role of rho-kinase gene polymorphisms and protein expressions in colorectal cancer development. *Pathobiology*. 2013;80:138-45.
250. Zucchini C, Martinelli M, De Sanctis P, Rodia MT, Mattei G, Ugolini G, Montroni I, Ghignone F, Solmi R. Possible Gender-Related Modulation by the ROCK1 Gene in Colorectal Cancer Susceptibility. *Pathobiology*. 2015;82:252-8.

251. Kalender ME, Demiryürek S, Oztuzcu S, Kizilyer A, Demiryürek AT, Sevinc A, Dikilitas M, Yildiz R, Camci C. Association between the Thr431Asn polymorphism of the ROCK2 gene and risk of developing metastases of breast cancer. *Oncol Res.* 2010;18:583-91.
252. Seasholtz TM, Wessel J, Rao F, Rana BK, Khandrika S, Kennedy BP, Lillie EO, Ziegler MG, Smith DW, Schork NJ, Brown JH, O'Connor DT. Rho kinase polymorphism influences blood pressure and systemic vascular resistance in human twins: role of heredity. *Hypertension.* 2006;47:937-47.
253. Liu L, Cao Y, Cui G, Li Z, Sun J, Zhang L, Chen C, Wang Y, Wang P, Ding H, Wang DW. Association analysis of polymorphisms in ROCK2 with cardiovascular disease in a Chinese population. *PLoS One.* 2013;8:e53905.
254. Demiryurek AT, Erbagci I, Oztuzcu S, Alasehirli B, Ozkara E, Seker M, Sönmez A, Ozsan M, Camci C. Lack of association between the Thr431Asn and Arg83Lys polymorphisms of the ROCK2 gene and diabetic retinopathy. *Curr Eye Res.* 2010;35:1128-34.
255. Yanardağ Açıık D, Yılmaz M, Sarı İ, Öztuzcu S, Sayiner ZA, Subari S, Demiryürek AT. Investigation of Rho-Kinase Expressions and Polymorphisms in Mantle Cell Lymphoma Patients. *Turk J Haematol.* 2016;33:141-7.
256. Yoo SY, Kim J, Cheong S, Shin DH, Jang J, Lee C, Tahk SJ, Shin JH, Choi SY, Yoon MH. Rho-associated kinase 2 polymorphism in patients with vasospastic angina. *Korean Circ J.* 2012;42:406-13.

257. Palmieri A, Scapoli L, Carrozzo M, Cura F, Morselli PG, Pannuto L, Nouri N, Carinci F, Lauritano D, Martinelli M. ROCK1 is associated with non-syndromic cleft palate. *J Oral Pathol Med*. 2020;49:164-168.
258. Yoshida T, Kato K, Yokoi K, Oguri M, Watanabe S, Metoki N, Yoshida H, Satoh K, Aoyagi Y, Nishigaki Y, Nozawa Y, Yamada Y. Association of genetic variants with chronic kidney disease in individuals with different lipid profiles. *Int J Mol Med*. 2009;24:233-46.
259. Pandey P, Mohammad G, Singh Y, Qadar Pasha MA. ROCK2 and MYLK variants under hypobaric hypoxic environment of high altitude associate with high altitude pulmonary edema and adaptation. *The Application of Clinical Genetics*. 2015;8:257–267.
260. Peterson H, Laivuori H, Kerkelä E, Jiao H, Hiltunen L, Heino S, Tiala I, Knuutila S, Rasi V, Kere J, Kivinen K. ROCK2 allelic variants are not associated with pre-eclampsia susceptibility in the Finnish population. *Molecular Human Reproduction*. 2009;15:443–449.
261. Aksoy M, Uygun H, Baspinar O, Demiryurek S, Oztuzcu S, Cengiz B, Irdem A, Araz NC. Is there any association between childhood cardiac septal defects and ROCK2 gene polymorphism?. *Genetics and Molecular Research*. 2014;13:1949–1954.
262. Gurocak S, Konac E, Ure I, Senol C, Onen IH, Sozen S, Menevse A. The impact of gene polymorphisms on the success of anticholinergic treatment in children with overactive bladder. *Disease Markers*. 2015;2015:732686.

263. Yigiter R, Bozkurt H, Oztuzcu S, Demiryürek S, Demir T, Uslu Kuzudisli S, Yilmaz M, Demiryürek AT. No evidence for an association between ROCK2 gene Thr431Asn polymorphism and idiopathic generalized epilepsy: Preliminary findings. *Journal of Neurological Sciences*. 2013;30:494-501.
264. Uslu Kuzudisli S, Yilmaz M, Gül Z, Demiryürek S, Yigiter R, Bozkurt H, Akcali A, Neyal M, Bagci C, Cengiz B, Oztuzcu S, Demiryürek AT. Investigation of the Rho-kinase 2 gene Thr431Asn polymorphism in migraine. *Neurology India*. 2014;62:9-14.

## 7. ANEXOS

### **Anexo I. Consentimiento informado.**

#### HOJA DE INFORMACIÓN A PACIENTES

TÍTULO DEL PROYECTO: Estudio del perfil de expresión de ARN en sangre periférica tras la ingesta de etanol

Nos dirigimos a usted para invitarle a participar en este estudio que se desarrolla en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca sobre la presencia de determinados micro ARN (un regulador de la expresión de determinados genes) en sangre tras el consumo de alcohol. El objetivo de este estudio, en líneas generales, es intentar analizar cómo el alcohol es capaz de inducir alteraciones en el sistema inmune tras el consumo de una cantidad importante del mismo. Poder avanzar en el conocimiento de estos aspectos resulta clave para mejorar el tratamiento de las complicaciones del consumo excesivo de alcohol.

Tendrá la oportunidad de hablar con su médico para aclarar todas sus dudas, y, tanto si decide participar como no participar en el estudio, esto no afectaría en ningún modo a la calidad de sus cuidados médicos futuros. Si usted desea participar, se utilizará una pequeña cantidad de sangre de la que le ha sido extraída, que permitirá el almacenamiento de productos derivados (suero y ácido ribonucleico [ARN] y desoxirribonucleico [ADN]) con los que realizar estudios de investigación.

Del suero y del ARN podremos estudiar la forma en que su organismo responde al consumo de alcohol, investigando sustancias o productos sanguíneos que puedan explicar el curso y desarrollo de las alteraciones que induce el etanol. La muestra de sangre para investigación se tomará de la que se la ha extraído de acuerdo al protocolo

habitual, por lo que no se producirán inconvenientes adicionales a su cuidado clínico habitual.

Se le pide su consentimiento para que con las muestras extraída se realice:

1. - Un almacenamiento de muestras (ARN, ADN y suero) por un tiempo indefinido, para que estén disponibles para la realización de estudios de investigación y conseguir un mejor conocimiento sobre su enfermedad. Si usted autoriza el almacenamiento de las muestras, éstas serán guardadas en parte en nuestro Hospital y en parte el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca. En dichas muestras no constará ningún dato de identificación personal y no será posible llegar a conocer su identidad a partir de cada muestra. Cada una de las muestras recibirá un número y nunca el personal investigador que lleve a cabo el estudio analítico conocerá su identidad.

2. – Análisis y estudios en dichas muestras que puedan aportar información sobre el efecto del consumo de alcohol.

Su participación es voluntaria y usted es libre de solicitar la retirada de sus muestras en cualquier momento por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre su tratamiento futuro.

Los resultados de las investigaciones y análisis de sus muestras están sometidos a la confidencialidad que da cobertura a todo el estudio. Sus resultados junto con los del resto de participantes, supondrán una fuente valiosa de información que revertirá en un mejor conocimiento de la enfermedad, con la consiguiente mejora de forma indirecta del cuidado. Sin embargo, los datos obtenidos de las muestras no le serán comunicados ni a usted ni a su médico, excepto en el caso de que los hallazgos tengan

implicación significativa en la salud de los participantes y exista una posibilidad real de mejora de su condición de salud. Los resultados serán analizados por grupos de investigadores y expertos.

Los resultados de los análisis realizados podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones científicas, manteniéndose la confidencialidad y no pudiendo ser identificados los pacientes.

No dude en recabar más información o en hablar con su médico para aclarar cualquier duda, tanto al inicio del estudio como en cualquier momento a lo largo del mismo.

Agradecemos su colaboración.



## HOJA DE CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

Yo,

con DNI nº

Declaro que:

1. He leído la hoja de información que me ha sido entregada.
2. He podido hacer preguntas sobre la obtención de sangre, almacenamiento y análisis de las muestras.
3. He hablado y he aclarado las dudas con el Dr.  
.....
4. Comprendo que mi participación es voluntaria.
5. Comprendo que puedo solicitar la destrucción de mis muestras en cualquier momento sin que esto repercuta en mis cuidados médicos futuros.
6. Presto libremente mi conformidad para que se realice la obtención de las muestras, y lo estipulado en el punto 1 y 2 de la Hoja de Información.

Fecha

Firma del participante

## **Anexo II. Listado de figuras.**

**Figura 1.** Consumo total de alcohol *per capita* en mayores de 15 años.

**Figura 2.** Consumo habitual, tipo *binge* y *HED* entre personas de 12 o más años en EEUU durante el año 2014.

**Figura 3.** Mecanismos directos e indirectos de la lesión hepática inducida por alcohol.

**Figura 4.** Efecto citotóxico del metabolismo del alcohol.

**Figura 5.** Mecanismos de muerte celular e inflamación hepática.

**Figura 6.** Dominios funcionales de las proteínas humanas ROCK1 (NP\_005397.1) y ROCK2 (NP\_005397.1).

**Figura 7.** Modos de activación de las rho-quinasas.

**Figura 8.** Señalización celular en la activación del NF- $\kappa$ B (Modelo simplificado).

**Figura 9.** Separación por gradientes de densidad.

**Figura 10.** Cámara de recuento Neubauer® Marienfeld-Superior™ 2017.

**Figura 11.** Retículas de una cámara de Neubauer.

**Figura 12.** Cámara incubadora de Billups-Rothenberg.

**Figura 13.** Astroцитos vistos al microscopio óptico.

**Figura 14.** Mecanismo de acción de las sondas TaqMan® en la PCR.

**Figura 15.** Esquema de las condiciones de la PCR a tiempo real para el genotipado de los polimorfismos.

**Figura 16.** Representación gráfica de la discriminación alélica del polimorfismo rs35996865 (T>G) del gen *ROCK1*.

**Figura 17.** Representación gráfica de la discriminación alélica del polimorfismo rs2230774 (G>T) del gen *ROCK2*.

**Figura 18.** Representación gráfica de la discriminación alélica del polimorfismo rs978906 (T>C) del gen *ROCK2*.

**Figura 19.** Expresión relativa de ROCK1 y ROCK2 en sangre periférica de pacientes con intoxicación alcohólica aguda y controles.

**Figura 20.** Expresión de ROCK1 y ROCK2 en sangre periférica de pacientes con intoxicación alcohólica aguda según edad.

**Figura 21.** Expresión de ROCK1 y ROCK2 en sangre periférica de pacientes con intoxicación alcohólica aguda según sexo.

**Figura 22.** Correlación entre la expresión de ROCK1 y la alcoholemia (g/L); casos.

**Figura 23.** Correlación entre la expresión de ROCK1 y la alcoholemia (g/L); casos excluyendo valor outlier.

**Figura 24.** Correlación entre la expresión de ROCK1 y la alcoholemia (g/L); muestra global.

**Figura 25.** Correlación entre la expresión de ROCK1 y la alcoholemia (g/L); muestra global excluyendo el valor *outlier*.

**Figura 26.** Expresión de ROCK1 en células PBMC de controles sanos intoxicadas con etanol “*in vitro*”.

**Figura 27.** Expresión de ROCK1 en astrocitos de ratón expuestos a etanol.

**Figura 28.** Expresión relativa del ARNm de ROCK1 en función de los genotipos en el polimorfismo *ROCK1* (rs35996865).

**Figura 29.** Expresión relativa del ARNm de ROCK2 en función de los genotipos en el polimorfismo *ROCK2* (rs2230774).

**Figura 30.** Expresión relativa del ARNm de ROCK2 en función de los genotipos en el polimorfismo *ROCK2* (rs978906).

**Figura 31.** Expresión relativa del ARNm de ROCK1 en función de la presencia alélica del polimorfismo *ROCK1* (rs35996865).

**Figura 32.** Expresión relativa de los genotipos en el polimorfismo *ROCK1* (rs35996865) limitado a los casos de la muestra global.

**Figura 33.** Expresión relativa del ARNm de ROCK1 en función de la presencia alélica del polimorfismo *ROCK1* (rs35996865).

**Figura 34.** Correlación entre la expresión de ROCK2 y la IL1-  $\beta$ ; muestra global.

**Figura 35.** Correlación entre la expresión de ROCK2 y la IL-8; muestra global.

**Figura 36.** Expresión de ROCK1 en CMSP de controles sanos intoxicadas con etanol *in vitro*.

**Figura 37.** Expresión de ROCK1 en astrocitos de ratón expuestos a etanol.

**Figura 38.** Expresión relativa del ARNm de ROCK1 en función de los genotipos en el polimorfismo *ROCK1* (rs35996865).

**Figura 39.** Expresión relativa del ARNm de ROCK2 en función de los genotipos en el polimorfismo *ROCK2* (rs2230774).

**Figura 40.** Expresión relativa del ARNm de ROCK2 en función de los genotipos en el polimorfismo *ROCK2* (rs978906).

**Figura 41.** Expresión relativa del ARNm de ROCK1 en función de la presencia alélica del polimorfismo *ROCK1* (rs35996865) en la muestra global.

**Figura 42.** Expresión relativa de los genotipos en el polimorfismo *ROCK1* (rs35996865) limitado a los casos de la muestra global.

**Figura 43.** Expresión relativa del ARNm de ROCK1 en función de la presencia alélica del polimorfismo *ROCK1* (rs35996865) en los casos.

### **Anexo III. Listado de tablas.**

**Tabla 1.** Criterios de inclusión y exclusión para casos y controles.

**Tabla 2.** Cuestionario entregado a los participantes en el estudio.

**Tabla 3.** Reactivos empleados para la realización de la transcripción inversa.

**Tabla 4.** Condiciones de la qPCR de las dos isoformas de la proteína ROCK (ROCK1 y ROCK2).

**Tabla 5.** Condiciones de la qPCR para el análisis de expresión del ARNm de la ACTB.

**Tabla 6.** Condiciones empleadas para el estudio del polimorfismo rs35996865 (T>G) del gen *ROCK1*.

**Tabla 7.** Condiciones empleadas para el estudio del polimorfismo rs2230774 (G>T) del gen *ROCK2*.

**Tabla 8.** Condiciones empleadas para el estudio del polimorfismo rs978906 (T>C) del gen *ROCK2*.

**Tabla 9.** Características clínicas de los casos con intoxicación alcohólica aguda y de los controles.

**Tabla 10.** Patrón de consumo de alcohol de los casos con intoxicación alcohólica aguda y de los controles.

**Tabla 11.** Correlaciones entre ROCK1/ROCK2 y TLRs.

**Tabla 12.** Correlaciones entre ROCK1/ROCK2 y citoquinas inflamatorias.

**Tabla 13.** Correlaciones entre ROCK1/ROCK2 y citoquinas inflamatorias sin el valor *outlier*.

**Tabla 14.** Distribución de los genotipos del polimorfismo rs35996865 del gen *ROCK1*.

**Tabla 15.** Distribución y presencia alélica del polimorfismo rs35996865 del gen *ROCK1*.

**Tabla 16.** Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2230774 del gen *ROCK2*.

**Tabla 17.** Distribución y presencia alélica del polimorfismo rs2230774 del gen *ROCK2*.

**Tabla 18.** Distribución de los genotipos del polimorfismo rs978906 del gen *ROCK2*.

**Tabla 19.** Distribución y presencia alélica del polimorfismo rs978906 del gen *ROCK2*.

**Tabla 20.** Expresión relativa de ARNm de ROCK1 y ROCK2 en función de los diferentes genotipos los diferentes genotipos de los polimorfismos *ROCK1* (rs35996865) y *ROCK2* (rs2230774 y rs 978906) y respectivamente, en la muestra global.

**Tabla 21.** Expresión relativa de ARNm de ROCK1 y ROCK2 en función de los diferentes genotipos los diferentes genotipos de los polimorfismos *ROCK1* (rs35996865) y *ROCK2* (rs2230774 y rs 978906) y respectivamente, en la muestra agrupada por casos.

**Tabla 22.** Expresión relativa de los diferentes genotipos de los polimorfismos *ROCK1* (rs35996865) y *ROCK2* (rs2230774 y rs978906), controles.

**Tabla 23.** Enfermedades relacionadas con el polimorfismo rs35996865 del gen *ROCK1*.

**Tabla 24.** Enfermedades relacionadas con el polimorfismo rs2230774 del gen *ROCK2*.

**Tabla 25.** Enfermedades relacionadas con el polimorfismo rs978906 del gen *ROCK2*.



